



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Desarrollo de micropartículas modificadas de
quitosano para el diagnóstico molecular de la
enfermedad de Chagas**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Martha Helena JAHUIRA ARIAS

ASESOR

Dra. Hilda María SOLIS ACOSTA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Jahaira, M. (2019). *Desarrollo de micropartículas modificadas de quitosano para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas*. Tesis para optar grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

METADATA COMPLEMENTARIA

1. Código ORCID del autor:
0000-0002-5514-4138
2. Código ORCID del asesor:
0000-0002-4610-7570
3. Grupo de Investigación:
Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI)
Laboratorio de Nanotecnología y Virología Molecular.
4. Institución que financia parcial o totalmente la investigación:
FINCYT, subvencionó de forma parcial la investigación. Contrato N° 118-PNICP-PIAP-2015.
5. Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación (incluirse localidades y/o coordenadas geográficas).
La Universidad Peruana Cayetano Heredia se encuentra en Av. Honorio Delgado 430, Urb. Ingeniería, S.M.P. Lima - Perú.
El laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) se encuentra dentro de la UPCH en un edificio de 2.200 m² por piso y el laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) se encuentra dentro de ese edificio.
El LIEI cuenta con 4 áreas: Inmunología y Cultivos celulares, Biología Molecular, Tuberculosis (Luz Caviedes) y el Laboratorio de Nanotecnología y Virología de 70 m² a cargo del Dr. Holger Mayta.
Página web: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/investigacion/lieinfecciosas>
6. Año o rango de años que la investigación abarcó:
2015-2017
7. DNI
42204728



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 040-UPG-FCB-2018

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO
ACADEMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Siendo las 15:10 horas del día 31.05.2019 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por la:

Dra. Libertad Alzamora Gonzales	e integrado por
Dr. Julio César Santiago Contreras	(Miembro)
Dra. Fanny Elizabeth Lazo Manrique	(Miembro)
Dr. Jaime Roberto Sánchez Venegas	(Miembro)
Dra. Hilda María Solís Acosta	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara la Señorita Magíster Doña **MARTHA HELENA JAHUIRA ARIAS**.

Después de darse lectura al Expediente N° 040-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“DESARROLLO DE MICROPARTÍCULAS MODIFICADAS DE QUITOSANO PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS”,
y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



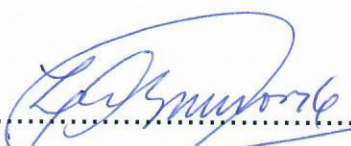
UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Muy Bueno con la nota de 18*

A continuación la Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas a la Magíster MARTHA HELENA JAHUIRA ARIAS.


Siendo las... *16:45*... se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día viernes 31 del mes de mayo del año 2019.


.....
Dra. Libertad Alzamora Gonzales
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE


.....
Dra. Hilda María Solís Acosta
Profesora Principal a T.C.
ASESORA


.....
Dra. Fanny Elizabeth Lazo Manrique
Profesora Principal a D. E.
MIEMBRO


.....
Dr. Julio César Santiago Contreras
Profesor Principal a T.C.
MIEMBRO


.....
Dr. Jaime Roberto Sánchez Venegas
Profesor Asociado a D.E.
MIEMBRO

AGRADECIMIENTO

A los miembros del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y especialmente al Dr. Robert Gilman, quien me dio la oportunidad de participar en diferentes proyectos de Investigación, brindándome sus conocimientos, experiencias y pasión por la investigación.

Al Dr. Holger Mayta por la confianza brindada para iniciar esta línea de investigación, por su asistencia profesional a lo largo del desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Inés Gárate por guiar las primeras etapas del presente trabajo.

A la Dra. Hilda Solís por sus continuas sugerencias para dirigir mi trabajo de investigación.

A la Dra. Libertad Alzamora por su valioso aporte y por su exhaustiva revisión y sugerencias que han permitido mejorar y culminar con éxito mi tesis.

Al Dr. Julio Santiago por sus sugerencias, recomendaciones y el apoyo brindado para culminar con mi tesis.

A los investigadores de la Universidad Nacional de Ingeniería: Dra. Ana Valderrama, Christian Jacinto, Illy Maza por su aporte y colaboración para alcanzar parte de los objetivos del proyecto.

A las personas que intervinieron directamente en esta investigación: Janet Acosta, Leny Sánchez, Edith Arocutipa, Alejandra Pando, por su gran capacidad profesional y su amistad a lo largo del desarrollo de mi tesis, así como a Yagahira Castro, Noelia Angulo, sin su aporte y ayuda no hubiera logrado este gran avance, valoro mucho su amistad.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (INNOVATE PERÚ) que a través del Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT) -118- PNICP-PIAP-2015, permitió dar inicio a mi investigación.

A todas las personas que conocí y me ha acompañado durante el desarrollo de la presente tesis.

DEDICATORIA

A Dios por su inmenso e infinito amor, quien me ha permitido llegar a este momento de avance profesional y personal.

Con amor a mi madre Juana y mi padre Mario, por su constante aliento y su apoyo incondicional, por estar siempre conmigo y por ser ambos mi principal modelo a seguir. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A mis hermanos Edwin, Keendys y a los pequeños de la familia Andree, Daniel, Kiara, Randy, este logró es también de Uds.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Enfermedad de Chagas	3
2.2. Chagas congénito	5
2.3. ADN libre circulante: perspectivas como biomarcador en el diagnóstico molecular	6
2.4. ADN transrenal y su aplicación en el diagnóstico	7
2.5. Nanobiotecnología	10
2.5.1. Nanomedicina	10
2.6. Quitosano	12
2.7. Formación de complejos de quitosano y ADN	16
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
3.1. Hipótesis	18
3.2. Objetivos	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. Tipo de Estudio	19
4.2. Flujograma Experimental	19
4.3. Síntesis y caracterización de micropartículas modificadas en base a quitosano	21

4.4.	Evaluación <i>in vitro</i> de la adsorción – desorción del ADN usando micropartículas modificadas en base a quitosano	23
4.4.1.	Extracción del material genético	23
4.4.2.	Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.....	26
4.4.3.	Selección del grupo de micropartículas de quitosano modificadas con capacidad de adsorción de ADN	30
4.4.4.	Pre-tratamiento de las muestras de orina.....	32
4.4.5.	Determinación del pH óptimo para la adsorción de ADN usando micropartículas de quitosano	32
4.4.6.	Concentración óptima de micropartículas de quitosano para la captura de ADN	33
4.4.7.	Tiempo de contacto óptimo entre las micropartículas de QE al 1%y el ADN	34
4.4.8.	Métodos de desorción del ADN de las micropartículas de quitosano en orina.....	34
4.4.9.	Límite de detección de ADN usando micropartículas de quitosano.....	35
4.5.	Evaluación <i>in vivo</i> de la sensibilidad y especificidad del uso de micropartículas de quitosano modificadas para el diagnóstico molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> en orina	36
4.6.	Análisis estadísticos.....	38
V.	RESULTADOS.....	40
5.1.	Síntesis y caracterización de micropartículas modificadas en base a quitosano	40
5.1.1.	Síntesis de micropartículas modificadas en base a quitosano.....	40
5.1.2.	Caracterización de micropartículas.....	42
5.2.	Evaluación <i>in vitro</i> de la adsorción – desorción del ADN usando micropartículas modificadas en base a quitosano	45
5.2.1.	Extracción de material genético.....	45
5.2.2.	Selección del grupo con capacidad de adsorción del ADN.....	47
5.2.3.	Determinación del pH del medio para la adsorción de ADN.....	49
5.2.4.	Determinación de la concentración de micropartículas de quitosano entrecruzado para la adsorción de ADN.....	51

5.2.5. Determinación del tiempo óptimo entre las micropartículas de QE al 1% y el ADN	53
5.2.6. Determinación del método de desorción del ADN	55
5.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la sensibilidad y especificidad del uso de micropartículas QE al 1 % para el diagnóstico molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> en orina	60
VI. DISCUSIÓN	65
6.1. Síntesis y caracterización de micropartículas modificadas en base de quitosano	65
6.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la adsorción- desorción del ADN usando micropartículas en base a quitosano	68
6.2.1. Factores para la formación de complejos quitosano – ADN	71
6.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la sensibilidad y especificidad del uso de micropartículas de quitosano modificadas para el diagnóstico molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
VII. CONCLUSIONES	81
VIII. RECOMENDACIONES.....	82
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
X. ANEXOS.....	97
XI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiología de Chagas.	3
Figura 2. Cronología de los descubrimientos de cfDNA.	7
Figura 3. Micro y/o nanoplateforma multifuncional para terapia génica.	12
Figura 4. Estructura del Quitosano.	12
Figura 5. Grupos funcionales del quitosano.	15
Figura 6. Esquema de la reacción del quitosano cuaternario.	16
Figura 7. Mecanismos de las plataformas basadas en quitosano – ADN.	17
Figura 8. Flujograma experimental.	20
Figura 9. Esquema del vector clonado pZERO-2.	24
Figura 10. Procedimiento general de adsorción – desorción de ADN usando micropartículas modificadas de quitosano.	31
Figura 11. Diferentes tipos de micropartículas modificadas en base a quitosano.	41
Figura 12. Espectros FTIR de quitosano cuaternario.	42
Figura 13. Espectros FTIR de quitosano entrecruzado.	43
Figura 14. Espectros FTIR de quitosano cuaternario entrecruzado.	44
Figura 15. Curva estándar construida con el número de copias del plásmido.	45
Figura 16. Curva estándar construida con el número de parásitos/mL.	46
Figura 17. Evaluación de tres diferentes tipos de micropartículas modificadas de quitosano.	47
Figura 18. Evaluación de tres diferentes micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído.	48
Figura 19. Efecto de la modificación del pH en medio artificial y orina sobre la adsorción de ADN por micropartículas QE1%.	50
Figura 20. Efecto de la concentración de micropartículas QE 1% y la captura de ADN.	52
Figura 21. Efecto del tiempo entre las micropartículas de QE 1%	54
Figura 22. Medios de desorción del ADN en orina.	55
Figura 23. Comparación del límite de detección de ADN plasmídico en orina. ...	57
Figura 24. Comparación del límite de detección de ADN de la región	58
Figura 25. Comparación del límite de detección de ADN de la región del kinetoplasto de <i>T. cruzi</i> en orina.	59

Figura 26. Distribución de los resultados del qPCR de dos diferentes regiones de ADN de <i>T. cruzi</i> usando micropartículas de QE1 %.....	62
Figura 27. Sensibilidad del qPCR en diferentes periodos de infección.	64
Figura 28. Quitosano de mediano peso	100
Figura 29. Disolución del quitosano en Ac. acético.	100
Figura 30. Entrecruzamiento de las micropartículas con glutaraldehído	100
Figura 31. Micropartículas de QE 1%.....	100
Figura 32. Pesaje de las micropartículas.....	101
Figura 33. Homogenización de las muestras de orina	101
Figura 34. Muestras en el homogeneizador	101
Figura 35. Adición del ADN extraído	101
Figura 36. Placa de PCR en microcentrífuga	102
Figura 37. Placa de PCR en termociclador de tiempo real.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos usados en el qPCR para la detección de ADN de <i>T. cruzi</i>	28
Tabla 2. Condiciones del ciclado del qPCR para la detección de ADN de <i>T. cruzi</i>	29
Tabla 3. Clasificación de casos y controles del modelo animal <i>Cavia porcellus</i> ..	37
Tabla 4. Tabla 2 x 2 de cálculo para evaluar la sensibilidad y especificidad	39
Tabla 5. Concentración de micropartículas de quitosano QE 1% en diferentes volúmenes y la capacidad de captura de ADN	51
Tabla 6. Sensibilidad y especificidad del qPCR de dos regiones de ADN de <i>T. cruzi</i> empleando micropartículas de QE 1%.....	61
Tabla 7. Valores de sensibilidad, especificidad, VPP,VPN en animales infectados experimentalmente.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNk: Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto

ADNsat: Ácido desoxirribonucleico satélite

AE: Tampón de elución (10mM Tris-Cl, 05mM EDTA; pH 9)

ANOVA: Prueba estadística de análisis de varianza

ARN: Ácido ribonucleico

AW1: Tampón de lavado 1

AW2: Tampón de lavado 2

BCAS1: Es una proteína codificada por el gen BCAS (Breast carcinoma)

Bp: Pares de bases

cfDNA: ADN circulante libre

c-MYC: Protooncogén, la proteína codificada por el gen c-Myc.

Cq: Ciclo umbral

CTAB: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio

CTAG: Cloruro de glicidiltrimetilamonio

DD: Grado de N-desacetilación

EB: Tampón de elución (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FTIR: Espectroscopia Infrarrojo transformado por Fourier

GR: Gramos

GTA: Glutaraldehído

HAI: Técnica de Hemaglutinación indirecta

HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

HIV1: Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

IAC: Control interno de amplificación (internal amplification control)

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

kADN: ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*

satADN: ADN del satélite de *T. cruzi*

MES: Ácido 2 - Morfolino etano sulfónico

MW: Peso molecular

NH₂: Grupo amino

NHCOCH₃ : Grupo N-acetilo

MIN: Minutos

NG: Nanogramos

NTD: Enfermedades Tropicales Desatendidas “Neglected Tropical Diseases”

OH: Grupo hidroxilo

OMS: Organización mundial de la salud

PAHO: Organización panamericana de la salud

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pb: pares de bases

pH: Potencial de hidrógeno

pka: Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil

pZero-2: Vector para la clonación de alto rendimiento de inserciones de ADN

QC: Quitosano cuaternario

QCE: Quitosano cuaternario entrecruzado

QE: Quitosano entrecruzado

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo

ROX: Colorante fluoróforo utilizado como referencia pasiva

SDS: Dodecilsulfato sódico

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TIP: Acuaporina localizada en el tonoplasto

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

Tr-DNA: Ácido desoxirribonucleico transrenal

WHO: World Health Organization

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*), constituye un importante problema de salud pública en América Latina y una amenaza emergente a nivel mundial. El diagnóstico directo está basado en la observación microscópica del parásito, pero tiene baja sensibilidad en la fase crónica; las técnicas moleculares incrementan la sensibilidad, pero aún es limitado. El uso novedoso de micro y/o nanoplateformas podrían incrementar su sensibilidad.

El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar micropartículas modificadas de quitosano con capacidad de adsorción de ácido desoxirribonucleico (ADN) para diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas.

Se sintetizaron y caracterizaron diferentes micropartículas de quitosano, se optimizó las condiciones de adsorción de ADN *in vitro* evaluando parámetros (tipo, pH del medio, concentración, tiempo y el método de desorción). Se determinó, el límite de detección de ADN plasmídico y ADN de *T.cruzi*. Se evaluó la sensibilidad y especificidad en la detección de ADN del kinetoplasto (ADNk) - 71P y ADN satélite (ADNsat) - C3 en muestras de orina obtenidas a los 14 y 45 días post-infección (dpi) en animales experimentalmente.

Los resultados mostraron que las micropartículas de quitosano entrecruzadas (QE) tienen mayor capacidad de adsorción de ADN. Se establecieron los siguientes parámetros óptimos: concentración de entrecruzante al 1%, el pH del medio a 6.9, tiempo de 60 minutos y el método de desorción EDTA-SDS. El límite de detección del ADN plasmídico fue de 10^1 copias/mL y del ADN de *T. cruzi* de 10^{-1} parásitos/mL. La sensibilidad fue mayor en la detección del ADNk con 71 %, con la región del ADNsat alcanzó 25%. La sensibilidad a los 14 dpi fue de 42 % en la detección de la región del ADNsat y 78% con la región del ADNk; a los 45 dpi fue de 7 % y 64% con la región de satélite del ADNsat y región del ADNk respectivamente. Se demostró la alta especificidad (100%) para ambas regiones. El método desarrollado es innovador, las micropartículas de QE tienen la capacidad de aislar y concentrar el ADN de *T.cruzi* en muestras de orina y podría usarse como biomarcador para el diagnóstico no invasivo de Chagas.

Palabras clave: Adsorción y desorción, biomarcador molecular enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, diagnóstico molecular, quitosano.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected tropical infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*), is a major public health problem in Latin America and an emerging threat in worldwide. Direct diagnosis is mainly based on the microscopic observation of the parasite but has low sensitivity mainly during the chronic phase; molecular techniques increase the sensitivity, but still limited. The novel use of micro and/or nanoplateforms can be used to increase the sensitivity.

The objective of the study was to develop different modified chitosan microparticles with capacity of adsorption of deoxyribonucleic acid (DNA) for the molecular diagnosis of Chagas disease.

Different microparticles of chitosan were synthesized and characterized, the DNA adsorption procedure was optimized evaluating parameters (type, pH of the medium, concentration, time and the desorption method) The limit of detection of plasmid DNA and *T. cruzi* DNA was determined. The sensitivity and specificity in the detection of kinetoplast DNA (kDNA) and satellite DNA (satDNA) was determined in urine samples of experimentally infected animals obtained at 14 and 45 days post-infection (dpi).

The results showed the glutaraldehyde crosslinked chitosan microparticles has the highest DNA adsorption. Using these microparticles the best conditions were obtained with: 1% glutaraldehyde, pH at 6.9, contact time of 60 minutes and EDTA-SDS as a desorption buffer. The detection limit of plasmid DNA was 10^1 copies/mL and *T.cruzi* DNA was 10^{-1} parasites/mL. Higher sensitivity was obtained with kDNA (71%) compared to satDNA (25%). The sensitivity in urine samples of infected animals at 14 dpi was 42% using ADNsat target and 78% with kDNA target; at 45 dpi with ADNsat target was 7% and with the ADNk target was 64%. High specificity (100%) was obtained for both targets in non-infected animals .

From this study we conclude: 1) The method is innovative. 2) Chitosan microparticles could be used to capture and concentrate *T.cruzi* DNA in urine (Tr-DNA) 3.The detection of Tr-DNA could be used for diagnosis of Chagas disease.

Keywords: Adsorption and desorption of DNA, Chagas disease, molecular biomarker, *Trypanosoma cruzi*, molecular diagnosis, chitosan, microparticles

I. INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana es considerada dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (NTD) es causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), capaz de infectar una amplia gama de hospederos mamíferos que incluyen animales silvestres y domésticos, así como humanos (WHO, 2015; Orozco *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013). Esta enfermedad fue descubierta hace más de 100 años, sin embargo todavía se estima que existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas en el mundo, 50 000 nuevos casos anuales y aproximadamente 70 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (Gomes *et al.*, 2004; WHO, 2015). Es uno de los principales problemas de salud pública, endémica de América Latina, pero en los últimos años se ha observado el incremento de pacientes chagásicos en regiones y/o países considerados como no endémicos, sin presencia del vector, como USA, Europa y Asia debido a la migración de casos incrementando así el riesgo de infección a través de la transmisión congénita, donación de sangre y órganos (Traina *et al.*, 2016; Wendling *et al.*, 2011).

Las medidas de control se basan en la interrupción de las principales vías de transmisión (Moncayo, 1992), no obstante, los métodos de diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad presenta dificultades asociadas a la baja sensibilidad y/o especificidad de los métodos actuales, limitando así su utilidad y la monitorización de la eficacia de los fármacos (Gomes *et al.*, 2009). Además de ello, la toma de muestras sanguíneas en infantes ha dificultado la aceptación por parte de los padres para su adecuada monitorización, esto a su vez puede generar un riesgo biológico ya que podrían estar infectados y se convertirían en reservorios, hecho importante para la bioseguridad.

Los métodos moleculares son basados en la amplificación de secuencias elegidas como diana, dependen inicialmente de la purificación de ADN, los sistemas actuales disponibles incluyen los de matriz sólida cuyos materiales de base son sílice y derivados (Grussu, 2012).

La presencia de ADN desde la muestra de orina ha sido reportada con éxito en el diagnóstico de agentes de parasitosis, ya que fragmentos cortos provenientes de la circulación pueden pasar la barrera renal (Su *et al.*, 2004a, Su *et al.*, 2004b; Su *et al.*, 2008), pero la desventaja radica en la baja cantidad de material genético contenida en ella, esto debido a efectos de dilución, por lo tanto, no son detectables por métodos convencionales.

La nanobiotecnología es un área emergente que incluye aplicaciones en el diagnóstico biomédico (Jain *et al.*, 2015). Existen diferentes fuentes de micro y nanomateriales, recientemente por sus propiedades los biopolímeros han empezado a ser estudiados, siendo el quitosano uno de ellos, como resultado de la desacetilación parcial de quitina natural producida a partir de los exoesqueletos de crustáceos o las paredes celulares de los hongos (Bruck *et al.*, 2011; Knezevic–Jugovic *et al.*, 2011). El peso molecular, el grado de desacetilación y la distribución de los grupos químicos influyen fuertemente en las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano afectando directamente su utilidad (Arca *et al.*, 2009).

El quitosano debido a su carga catiónica proporcionada por sus grupos químicos, especialmente el amino puede tener la capacidad de formar complejos (micro/nanométricos) con ácidos nucleicos cargados negativamente por los grupos fosfato a través de diversas interacciones, generando mejoras en su rendimiento, adicionalmente, las modificaciones químicas del quitosano podrían incrementar su eficiencia.

En los últimos años se está desarrollando herramientas de diagnóstico más prácticas, convenientes y precisas usando muestras no invasivas, el presente estudio tiene como objetivo sintetizar micropartículas modificadas en base a quitosano con capacidad para la captura y detección de ADN de *T. cruzi* por PCR cuantitativo en tiempo real, como método innovador para su aplicación en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas a partir de muestras no invasivas como la orina.

II. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, afecta principalmente a 21 países de América, donde 7 a 8 millones de personas actualmente se encuentran infectadas, 25 millones en riesgo de ser infectadas y con 10 mil muertes anuales, convirtiéndose en un problema de salud pública debido a la creciente migración de países y regiones endémicas a otras no endémicas como USA y Europa (Figura 1) (Ramírez *et al.*, 2015).

En el Perú, se ha logrado grandes avances a partir de los programas de control vectorial realizado por el MINSA (Náquira, 2014), no obstante, se han reportado casos en los últimos 6 años en las ciudades de Amazonas, Cajamarca, San Martín, Junín, Ucayali, Huánuco, Ica, Moquegua, Tacna, y Arequipa, siendo esta última quien reporta el mayor número de casos (CDC-Perú, 2018) (Anexo 4).



(Fuente: Imagen recuperada de <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas>)

Figura 1. Epidemiología de Chagas.

Los principales mecanismos de transmisión son: vectorial, donde el parásito es transmitido por el triatmino vector; congénita, donde la transmisión es de madre a hijo; oral a través de la ingestión de comida o bebida contaminada y iatrogénica por transfusión de sangre contaminada o trasplante de órganos infectados (Chatelain, 2017).

Esta enfermedad se caracteriza por dos fases: fase aguda, se realiza el diagnóstico clínico solo en el 5 % de los casos, el 95% restante presenta sintomatología inespecífica, los métodos directos son las principales herramientas de diagnóstico, sin embargo, presentan limitaciones. Después de esta fase aguda inicial si no se trata, los pacientes inician una fase crónica que dura varias décadas o persiste indefinidamente, esta fase se caracteriza por la ausencia de signos o síntomas y parasitemia muy baja (Ramos, 2005; Chatelain, 2017), donde los linfocitos T constantemente están evadiendo al parásito y cuando el sistema inmune está inmunodeprimido se produce la reactivación de *T. cruzi* (Tarleton, 2015), el diagnóstico usualmente es por métodos indirectos basados en técnicas serológicas (IFI, HAI, ELISA), sin embargo, teniendo en cuenta la baja sensibilidad en neonatos con baja parasitemia y en pacientes co-infectados por VIH, además la posibilidad de reacción cruzada con anticuerpos de otros parásitos del mismo grupo como *Leishmania sp.* o *Trypanosoma rangeli* (Brasil *et al.*, 2010) ha limitado su utilidad.

La OMS recomienda para el diagnóstico el uso de dos pruebas basadas en diferentes principios y en caso de discordancia una tercera para la confirmación de infección (WHO, 2010). Por ello, actualmente se está aplicando métodos moleculares y además se recomienda su uso para el diagnóstico de la enfermedad Chagas congénito en recién nacidos, control de pacientes con trasplantes de órganos, pacientes inmunosuprimidos - SIDA, pacientes con transmisión oral, y además como biomarcador post- tratamiento (Schijman *et al.*, 2011).

A pesar de las diferentes iniciativas promovidas, la enfermedad de Chagas aún es considerada una amenaza permanente, el nuevo reto es proteger los logros,

identificar y atender a los infectados asintomáticos e interrumpir la transmisión congénita (PAHO, 2018) .

2.2. Chagas congénito

Se calcula que en áreas endémicas existe alrededor de 2 millones de mujeres en edad reproductiva que viven infectadas con *T. cruzi* y se estima que de ellas, cerca del 4 y el 8% transmitirán la infección al feto mediante la vía transplacentaria, como consecuencia, existe la probabilidad de unos 15 000 niños infectados al nacer con Chagas congénito (Carlier & Torrico, 2003). Además, en áreas donde se ha logrado el control integrado del insecto vector, la transmisión congénita es la principal ruta de transmisión epidemiológica, se estima un 22% de nuevos casos en Latinoamérica (Carlier *et al.*, 2015; Messenger & Bern, 2018).

El primer caso reportado fue en 1949, se observó tripomastigotes circulantes en sangre del recién nacido. A partir de este caso se vienen reportando muchas referencias bibliográficas en relación a transmisión congénita (Bern *et al.*, 2009; Traviezo, 2013; Messenger & Bern, 2018).

No obstante, la baja sensibilidad de las técnicas directas para el diagnóstico de Chagas congénito es el principal reto para los programas de control (PAHO, 2018), por ello, es importante la continua implementación de los programas de control de transmisión vertical, diagnóstico, tratamiento y seguimiento adecuado para las personas infectadas (Roca *et al.*, 2015). Los programas actuales de detección emplean microscopía de muestras de sangre al nacer y al mes de nacimiento, posteriormente son seguidos por pruebas serológicas entre los 6 – 12 meses de edad, esta metodología ha sido reportada en la investigación de Bern *et al.*, (2009) demostrando la baja sensibilidad (<50% en una sola muestra), la serología en la infancia tardía tiene sensibilidad, pero las tasas de seguimiento y/o monitoreo son menores al 20%, por lo tanto, el 80% de los niños en riesgo no culminan el programa de seguimiento y/o monitoreo, por ello se recomienda técnicas moleculares para mejorar la detección temprana (Bern *et al.*, 2009; Castro-Sesquen *et al.*, 2014).

El oportuno tratamiento en mujeres antes del embarazo tiene una probabilidad menor de transmitir la enfermedad de Chagas a sus bebés, sin embargo, aún se requiere que la comunidad científica desarrolle una prueba de alta sensibilidad que permita el diagnóstico inmediato al nacer y/o antes que el bebé y la madre se retiren del centro de salud, de modo tal, iniciar el tratamiento oportuno, el cual es altamente eficaz en la fase aguda de la enfermedad (Messenger & Bern, 2018).

2.3. ADN libre circulante: perspectivas como biomarcador en el diagnóstico molecular

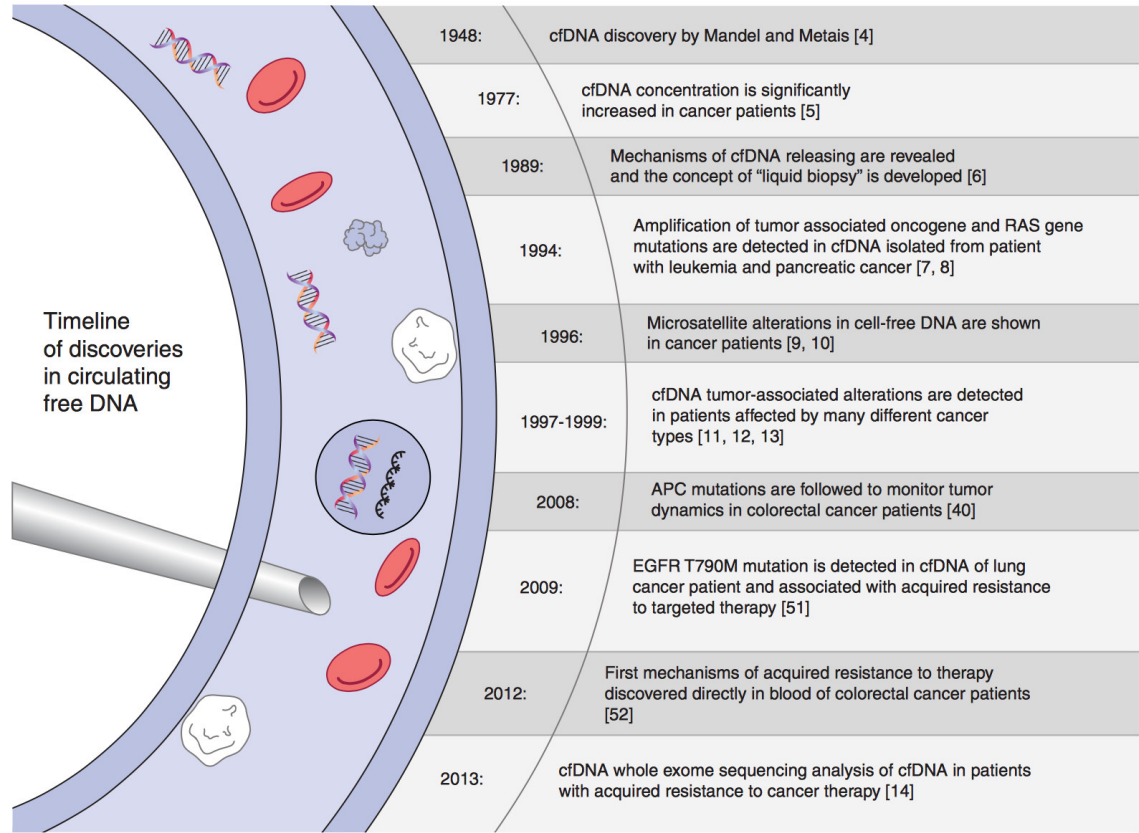
En recientes años, se están desarrollando herramientas más prácticas para la detección de biomarcadores desde muestras sanguíneas y otros fluidos corporales (Weekeroon *et al.*, 2016).

Uno de los más ampliamente estudiados es la detección de ADN libre circulante (cfDNA), el cual comprende fragmentos de ADN encontrados extracelularmente, libremente y principalmente en la circulación, la longitud de los fragmentos puede estar entre menos de 500 hasta 21 mil pares de bases (pb), también se puede detectar en saliva, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo (CSF), líquido peritoneal, líquido sinovial, linfa, líquido amniótico y la orina, sin embargo la mayoría de investigaciones se han centrado en su detección a partir de muestras invasivas como el plasma y suero sanguíneo, sin embargo se requiere muestras no invasivas, actualmente se está explorando cfDNA desde líquidos fácilmente accesibles que pueden obtenerse mediante métodos no invasivos, como la orina. (Weekeroon *et al.*, 2016; Martínez – Esquerro *et al.*, 2007).

La existencia del cfDNA se evidenció por primera vez en 1948, sin embargo hasta 1960 tuvo repercusión de importancia en procesos patológicos, varios estudios se enfocaron la detección de cfDNA en plasma y suero sanguíneo en pacientes con diferentes enfermedades (Figura 2). Ej: la comparación de niveles de cfDNA de personas enfermas con cáncer con personas sanas. Los mecanismos planteados son: a) la muerte celular b) lisis (destrucción) de células cancerosas, c) la

liberación activa y espontanea de ADN (Martínez – Esquero *et al.*, 2008; Siravegna & Bardelli, 2014).

La cantidad de cfDNA también está influenciada por diversos factores, los ácidos nucleicos se eliminan de la sangre por el hígado y los riñones y tienen una vida media variable en la circulación, que varía entre 15 min y varias horas. Numerosos estudios muestran que prácticamente todas las células vivas liberan activamente fragmentos de ADN (Siravegna & Bardelli, 2014).



(Fuente: Siravegna & Bardelli, 2014)

Figura 2. Cronología de los descubrimientos sobre los ácidos nucleicos circulantes (cfDNA).

2.4. ADN transrenal y su aplicación en el diagnóstico

La presencia de ácidos nucleicos libre (cfDNA) circulante excretado en orina es denominado como ADN transrenal (Tr-ADN) y está siendo estudiada en los últimos años, al ser una muestra menos infecciosa, no-invasiva y accesible en

grandes volúmenes en comparación a otros fluidos biológicos, demostrando que pueden utilizarse como fuente de material genético para la aplicación de pruebas moleculares (Umansky & Tomei, 2006).

Los fragmentos de ADN libre circulante en orina procede de dos diferentes fuentes: fragmentos de ADN de alto peso molecular derivados del desprendimiento de células del propio tracto urinario y fragmentos de bajo peso molecular capaz de atravesar la barrera renal por procesos de apoptosis asociado con la ruptura o disociación internucleosomal de la cromatina por nucleasas y como consecuencia, el ADN nuclear se degrada, produciendo nucleosomas, oligómeros y fragmentos de 150 a 250 pb (Su *et al.*, 2004a; Su *et al.*, 2004b; Umansky & Tomei, 2006).

El contenido total del ADN circulante es afectado por la acción de las nucleasas presentes en el organismo, por ello se estima que 0.5 - 2% de la ADN circulante total cruza la barrera renal, lo que finalmente es considerado Tr-ADN (Lichtenstein *et al.*, 2001).

El Tr-ADN ha sido empleado para el diagnóstico prenatal desde muestras de orina materna, mediante la detección de secuencias del cromosoma Y, esto ha sido útil en enfermedades como hemofilia, síndrome de X frágil, incompatibilidad del grupo Rh (Illanes *et al.*, 2006; Botezatu *et al.*, 2000).

Estudios indican que el Tr-ADN puede ser usado como herramienta complementaria para indicar el estado de los pacientes con transplante renal para evaluar el éxito del procedimiento o el rechazo del mismo, los resultados han demostrado que la presencia de ADN del donante en orina del paciente, está asociado al rechazo agudo renal, en pacientes con disfunción renal inducida por fármacos el ADN donante es negativo, en casos de infecciones urinarias valores de Tr-ADN se incrementa (Wagner, 2012).

Mutaciones específicas asociadas al cáncer fueron detectadas en orina, sugiriendo al Tr-ADN para detectar alteraciones específicas, especialmente en tumores renales y del tracto urinario, especialmente cáncer de vejiga. La

detección del gen k-Ras en orina mostró alta correlación con tejido tumoral en comparación al plasma y/o suero, sugiriendo una buena sensibilidad de la prueba con 95% de la incidencia de mutaciones en muestras de orina, otros estudios demostraron que el Tr-ADN podría ser un biomarcador potencial, confirmando la integridad del ADN con sensibilidad y especificidad por valores sobre el 70%, se logró detectar otros 3 oncogenes (c-MYC, BCAS1, HER2), actualmente nuevas plataformas de diagnóstico para diferentes tipos de cáncer en la detección de cambios genéticos y epigenéticos en una muestra de tejido tumoral después de una intervención quirúrgica podrían permitir una detección precoz de la recaída usando el Tr-DNA como fuente de material genético (Umansky & Tomei, 2006; Wagner, 2012; Salvi *et al.*, 2016).

Algunos estudios han reportado la detección de ADN proviral desde Tr- ADN en pacientes de HIV/AIDS y se logró la caracterización de RNA y DNA de HIV1 en orina, sugiriendo que la liberación del virus en orina es independiente a la carga viral en sangre (Umansky & Tomei, 2006).

En el diagnóstico molecular de agentes de enfermedades infecciosas ha sido también reportado el uso de ADN desde muestras no invasivas como la orina, logrando identificar agentes infecciosos como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania viannia*, *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, *Wuchereria bancrofti*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* y *Entamoeba histolytica* (Weerakoon & McManus, 2016), alguna de ellas han evaluado el nivel de infección y/o parasitemia entre muestras invasivas y no invasivas, encontrando gran correlación entre ellas y sugiriendo una posible herramienta de diagnóstico temprano de enfermedad (Umansky & Tomei, 2006).

Sin embargo, su aplicación es aún limitada debido a la baja cantidad de ADN, algunos factores involucrados son: el método de aislamiento de ácidos nucleicos, la elección del tamaño del amplicón de la reacción de PCR, el volumen de orina utilizado para el análisis y factores de inhibición del PCR (Umansky & Tomei, 2006; Melkonyan *et al.*, 2008).

2.5. Nanobiotecnología

La biotecnología y la nanotecnología son dos de las tecnologías más prometedoras del siglo XXI. De la asociación de la biotecnología y nanotecnología surge la Nanobiotecnología, por un lado la Nanotecnología se refiere al diseño, desarrollo y aplicación de materiales y/o dispositivos a escala nanométrica, un objeto “nano” es aquel comprendido entre 1 y 100 nanómetros, sin embargo desde el punto de vista productivo y de su utilización, la escala se puede extender hasta el milímetro. Por otro lado, la Biotecnología se refiere a la aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos incluidos microorganismos (Lechuga, 2010; Fakruddin *et al.*, 2012).

La definición de Nanobiotecnología se focaliza en dos áreas de actuación:

- Aplicación de herramientas, componentes y procesos de la Nanotecnología a los sistemas de diagnóstico y tratamientos terapéuticos con mayor eficiencia a los sistemas convencionales actuales, denominada como **Nanomedicina** (Lechuga, 2010).
- Uso de sistemas biológicos como moldes para el desarrollo de nuevos productos de escala nanométrica principalmente nanodispositivos electrónicos (Lechuga, 2010).

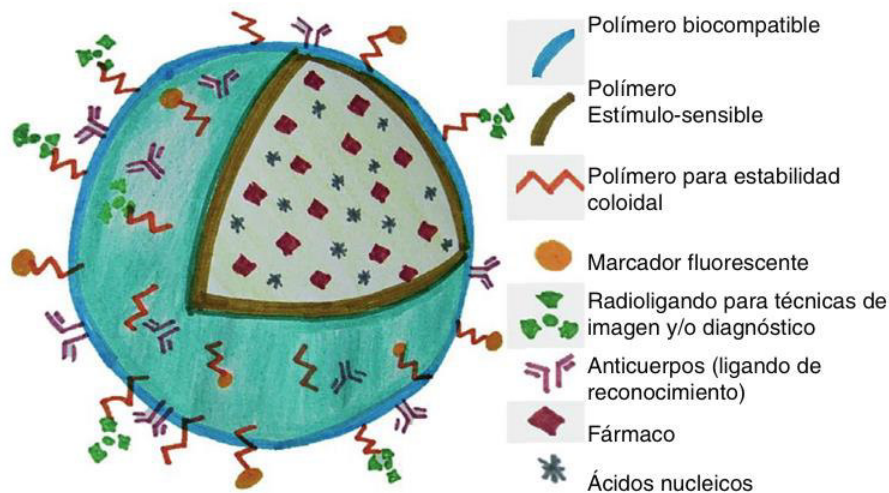
2.5.1. Nanomedicina

Actualmente se está estudiando la aplicación en el diagnóstico, prevención y el tratamiento de enfermedades.

Mediante la manipulación de propiedades físico-químicas e interacción con biología molecular, se están diseñando plataformas para terapia génica para el transporte de fármacos y/o ácidos nucleicos (Figura 3) (Rojas-Aguirre *et al.*, 2016).

En lo que se refiere al diagnóstico, la investigación en la detección de ácidos nucleicos usando micro y/o nanopartículas ha sido estudiado en un inicio usando micropartículas comerciales de oro con resultados muy prometedores (Xun *et al.*, 2009), después las nanopartículas magnéticas fueron capaces de mejorar la estabilidad, adsorción y protección frente a nucleasas del genoma de VIH, (Grussu, 2012), más tarde, se logró crear sondas ADN-magneto como método novedoso para la detección rápida y específica de patógenos en muestras clínicas (Chung *et al.*, 2013).

En la actualidad, los polímeros naturales son utilizados como biomateriales como parte de los productos de nanotecnología verde para contribuir a tener un planeta sostenible, uno de ellos es el quitosano cuya fuente principal son los residuos del exoesqueleto de crustáceos. Los primeros estudios lograron evaluar los efectos del pH en la formación de poros de los complejos ADN y quitosano, logrando la reducción de ellos a pH 7.2 debido a la integración entre los grupos fosfato del ADN y aminos (Fukushima *et al.*, 2005). Posterior a ello, se logró desarrollar y caracterizar microesferas de quitosano cargadas con ADN comercial, demostrando que pueden ser aptos como sistemas para la microencapsulación de ácidos nucleicos evitando así la degradación (Olivera *et al.*, 2012). Se ha reportado que diferentes micropartículas de quitosano modificadas están siendo estudiadas, se realizó la modificación mediante entrecruzamiento con glutaraldehído y se logró capturar ADN y la amplificación directa mediante PCR en tiempo real (Pandit *et al.*, 2015), las nanopartículas magnéticas con silica revestidas de quitosano permitieron el aislamiento de ADN genómico de saliva en respuesta al pH en la adsorción y desorción (Tiwari *et al.*, 2016) así también se ha publicado recientemente que las micropartículas de quitosano han sido utilizadas en la lisis y captura de ADN desde muestras de sangre (Nanayakkara *et al.*, 2017).

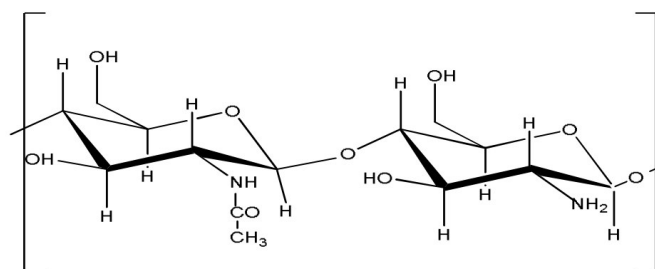


(Fuente: Rojas-Aguirre *et al.*, 2016)

Figura 3. Micro y/o nanoplateforma multifuncional para terapia génica.

2.6. Quitosano

El quitosano es un biopolímero lineal que está compuesto de cadenas $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucosamina (unidad deacetilada) y N-acetil D-glucosamina (unidad acetilada) unidas mediante enlaces O-glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 4), producto de la modificación de la quitina ya sea por vía química o microbiológica. Descubierta y aislada por Henry Braconnot en 1811. El exoesqueleto de los crustáceos es la principal fuente industrial de la quitina, especialmente el camarón y cangrejo, también es posible encontrarla como parte de la pared celular de hongos, diatomeas marinas (Beltran, 2010; Khairul, 2011; Nieto & Orellana, 2011).



(Fuente: Beltrán, 2010)

Figura 4. Estructura del Quitosano.

2.6.1. Propiedades del Quitosano

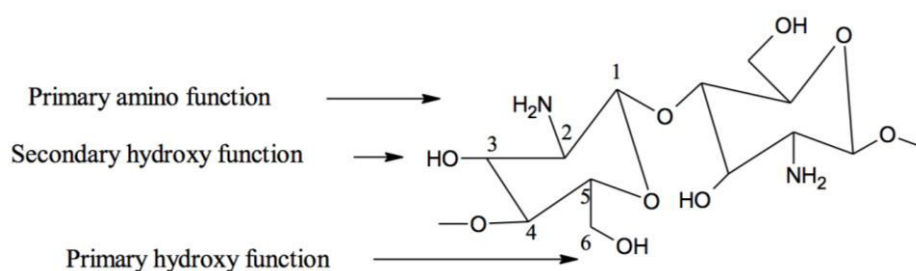
- a) Estructura cristalina. El quitosano es un polímero semicristalino, los grupos hidroxilos y el grupo N-acetil o amino suelen formar puentes de inter o intramoleculares de hidrógeno, la estructura cristalina depende de la disposición de ellos entre las cadenas poliméricas, sin embargo la cristalinidad del quitosano se ve afectada por la quitina de origen, En la naturaleza se han detectado tres formas polimorfos de quitina, α , β , y γ y la diferencia radica en la disposición de las cadenas, además el quitosano tiene diferentes formas alomorfos, las cuales dependen de la forma de preparación, grado de acetilación y de polimerización así como del contenido de agua (Shahidi & Abuzaytoun, 2005; Gamiz, 2016).
- b) Solubilidad. El quitosano no es soluble en agua y disolventes orgánicos puros, sin embargo, es soluble en medios ácidos diluidos debido a la presencia de grupos aminos libres en la estructura química, esto significa que la solubilidad del quitosano depende del medio de pH. El grupo amino en quitosano tiene un pK_a de 6,5, por lo que a $pH < 6,5$, el grupo amino (NH_2) es protonado ($-NH_3^+$). A $pH > 6,5$, los grupos amino no están protonados y el quitosano no es soluble. El ácido acético al 1% es generalmente el más usado para su disolución al igual que el ácido clorhídrico al 1% pero insoluble en ácidos sulfúrico y fosfórico, debido a la restricción de solubilidad del quitosano, se pueden llevar a cabo algunas reacciones de modificación en su estructura química para lograr la solubilidad en agua especialmente para ciertas aplicaciones biomédicas. (Shahidi & Abuzaytoun, 2005; Rajasree & Rahate, 2013; Gamiz, 2016).
- c) Grado de N-desacetilación (DD). Es la relación entre los grupos químicos amino ($-NH_2$) con respecto a la cantidad total de grupos químicos N-acetilo ($NHCOCH_3$) y amino ($-NH_2$). El DD es una de las propiedades más importantes porque influye en la solubilidad, adicionalmente el DD permite distinguir entre los polímeros quitina y quitosano, los cuales son esencialmente el mismo polímero con diferentes grados de DD, definido por el contenido de grupos amino libres, cuando el DD es cercano al 50 %

es denominado quitosano, así también, el rango de pH en el que pueda ser soluble aumenta, debido a la variación del pK_a . (Shahidi & Abuzaytoun, 2005; Rajasree & Rahate, 2013; Gamiz, 2016).

- d) **Peso Molecular (MW).** El peso molecular de quitosano varía con las fuentes de materia prima y el método de preparación, sin embargo, hasta el momento se clasifica en: quitosano de bajo peso molecular es <50 kDa, el quitosano de peso molecular medio es $50-100$ kDa y el quitosano de alto peso molecular es <150 kDa. El quitosano con alto peso molecular conduce a un mayor enredo entre las cadenas de polímero, proporcionando complejos más fuertes. En contraste, cuando el quitosano es de bajo peso molecular, el complejo es más débil. Los enredos entre las cadenas de polímeros se deben a fuertes asociaciones entre cadenas mediante la unión de puentes de hidrógeno. Distintos factores durante el desarrollo del quitosano pueden influenciar en el MW del biopolímero (temperatura, concentración de ácidos, tiempos de reacción), se ha reportado el MW del quitosano y su distribución tiene una influencia en sus propiedades físicas y químicas, así como en su funcionalidad (Rabea, 2003; Shahidi y Abuzaytoun, 2005; Rajasree & Rahate, 2013; Gamiz, 2016).

2.6.2. Modificación química del quitosano

El quitosano es una molécula susceptible de modificaciones químicas debido a sus tres grupos funcionales en su estructura: grupo amino (NH_2) en cada unidad desacetilada, los grupos hidroxilo (OH) primarios, secundarios en la posición C-2, C3 y C-6 unidos al anillo de glucopiranososa (Figura 5); para mejorar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas sin cambiar su estructura química fundamental (Gámiz, 2016; Rajasree & Rahate, 2013).



(Fuente: Rajasree & Rahate, 2013)

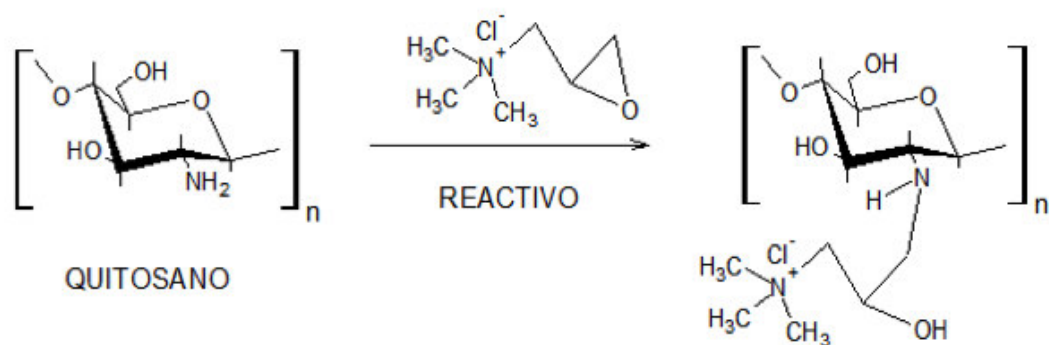
Figura 5. Grupos funcionales del quitosano.

Para incrementar la aplicación potencial del quitosano, se han sugerido métodos para su modificación las cuales permiten obtener nuevos compuestos biofuncionales (Rajasree & Rahate, 2013).

Los grupos hidroxilo pueden ser modificados por sustitución de los átomos de hidrógeno, pero sus reactividades son menores que las del grupo amino.

Las modificaciones básicamente en el grupo amino (NH_2) se han relacionado a las tecnologías de recuperación de metales (Guibal, 2004), actividad antimicrobiana (Rabea *et al.*, 2003), aplicaciones biomédicas (Berger *et al.*, 2004a, 2004b), vectores para terapia génica (Sinha *et al.*, 2004) y las modificaciones a nivel de los grupos hidroxilo (OH), se realiza mediante la incorporación de unidades hidrófobas.

Las modificaciones de quitosano más investigadas en diferentes áreas de aplicación son: N-alkilación, N-acilación del Quitosano, Quitosano tiolado, Quitosano sulfatado, Quitosano fosforilado, derivados del Quitosano cuaternizado (Figura 6) (Rajasree & Rahate, 2013).



(Fuente: Díaz, 2012)

Figura 6. Esquema de la reacción del quitosano cuaternario

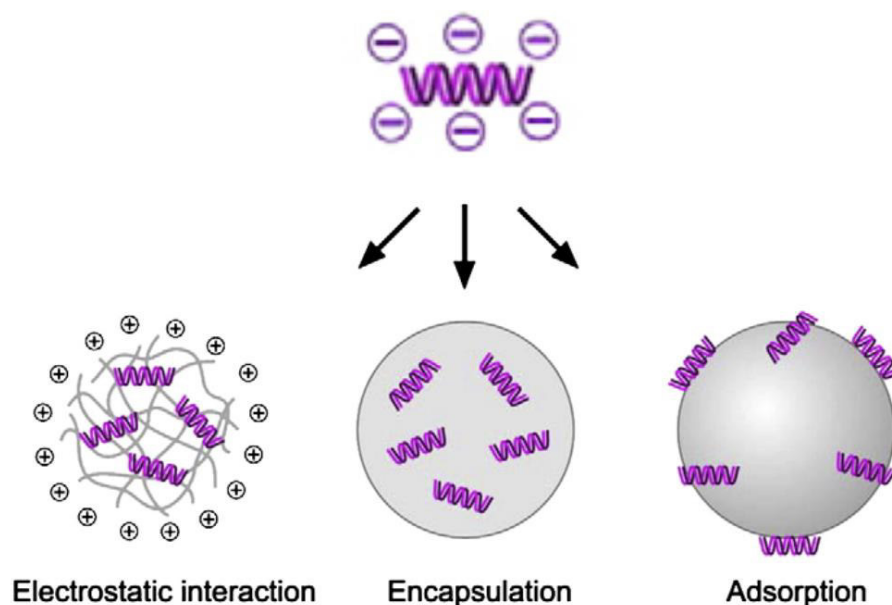
2.7. Formación de complejos de quitosano y ADN

Los complejos electrostáticos entre polielectrolitos cargados de forma opuesta que involucran a biopolímeros naturales han despertado interés en los últimos años y están siendo estudiados ampliamente para aplicaciones biomédicas (Nasti, 2016). El quitosano y sus derivados por su naturaleza policatiónica ha sido usado para formar policomplejos con proteínas y además tiene mayor capacidad de formar complejos con ADN o ARN y en comparación con otros polímeros catiónicos (Mao *et al.*, 2001) como portadores catiónicos seguros y eficientes en la liberación controlada de drogas principalmente por sus características como la alta biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad y bajo costo debido a su abundancia en la naturaleza (Mi *et al.*, 1999, Bravo-Anaya & Rinaudo, 2016) .

Las micro y/o nanoplataformas basados en quitosano están siendo utilizadas para la administración ideal de un fármaco y ácidos nucleicos como el ADN (incluido el ADN plasmídico) o ARN. Algunas investigaciones han reportado la formación de estos complejos, determinando su grado de unión, recomendando que las modificaciones del quitosano puede incrementar su eficiencia (Jain *et al.*, 2015).

Los posibles mecanismos de estos complejos se observa en la Figura 7 , algunas investigaciones indican que principalmente ocurren por “interacciones

electrostáticas“ especialmente entre los grupos protonados del quitosano (unidades de glucosamina) y los grupos cargados negativamente del ADN (fosfato) (Alatorre-Medaa *et al.*, 2009). Estudios recientes muestran también otro tipo de interacción no electrostática puede estar involucrada en la formación de estos complejos mediante las interacciones hidrofóbicas y enlaces de moléculas de hidrogeno (Mesai *et al.*, 2005).



(Fuente: Mao *et al.*, 2010)

Figura 7. Mecanismos de las plataformas basadas en quitosano – ADN.

La intensidad del policomplejo está también influenciada por la concentración de sales, el pH, la densidad de carga del polímero y el peso molecular, además el quitosano ha demostrado su capacidad para proteger el ADN contra la degradación de nucleasas y para transferir el ADN en varios tipos de células (Liao, 2012).

El valor de pK_a del quitosano es de alrededor de 6,3 - 6,4, por debajo de ello las aminos se protonan y facilita su unión con el ADN de carga negativa, la eficiencia de transfección es más alta a un pH de 6,8 a 7,0, cuando el pH del medio de transfección aumenta a 7,4, la eficiencia de transfección disminuye drásticamente debido a la disociación del complejo (Sato *et al.*, 2001).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

- Las micropartículas modificadas de quitosano tienen capacidad para capturar y concentrar el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *T. cruzi*, por lo que son aplicables para el diagnóstico molecular en tiempo real de la enfermedad de Chagas en muestras adquiridas de manera no invasiva como la orina.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo General

- Desarrollar micropartículas modificadas de quitosano para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas en muestras adquiridas de manera no invasiva como la orina.

3.2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar micropartículas modificadas en base a quitosano
- Evaluar *in vitro* la adsorción – desorción del ADN usando micropartículas modificadas en base a quitosano.
- Evaluar *in vivo* la sensibilidad y especificidad del uso de micropartículas de quitosano modificadas para el diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi* en orina.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tipo de Estudio

Esta investigación es de diseño experimental, la cual permite que el investigador controle la variable independiente para así determinar el efecto y/o influencia de la variable dependiente sobre la variable independiente.

4.2. Flujograma Experimental

El flujograma muestra de forma resumida la investigación realizada (Figura 8).

En un primer instante, se realizó la producción y obtención de 3 grupos diferentes de micropartículas modificadas en base al quitosano con su respectiva caracterización que demostró la modificación química realizada, también se aisló ADN plasmídico y parasitario (*Trypanosoma cruzi*) que fue utilizado en los ensayos *in vitro* para evaluar y seleccionar el grupo y tipo de micropartículas con la modificación química que permite la mejor capacidad de absorción de ADN.

En un segundo instante, el grupo seleccionado fue sometido a diferentes pruebas para optimizar y/o estandarizar las condiciones de protocolo (pH óptimo, concentración óptima, tiempo de formación de complejos quitosano – ADN, método de desorción, límite de detección) y así lograr incrementar la capacidad de adsorción del ADN.

Finalmente con este último protocolo generado se realizó la evaluación en muestras de orina de animales infectados experimentalmente (*Cavia porcellus*) mediante la amplificación de dos diferentes secuencias diana del ADN de *T. cruzi*, finalmente mediante ellos se determinó la sensibilidad y especificidad de la detección molecular de la enfermedad de Chagas en muestras de orina usando las micropartículas y el protocolo establecido.

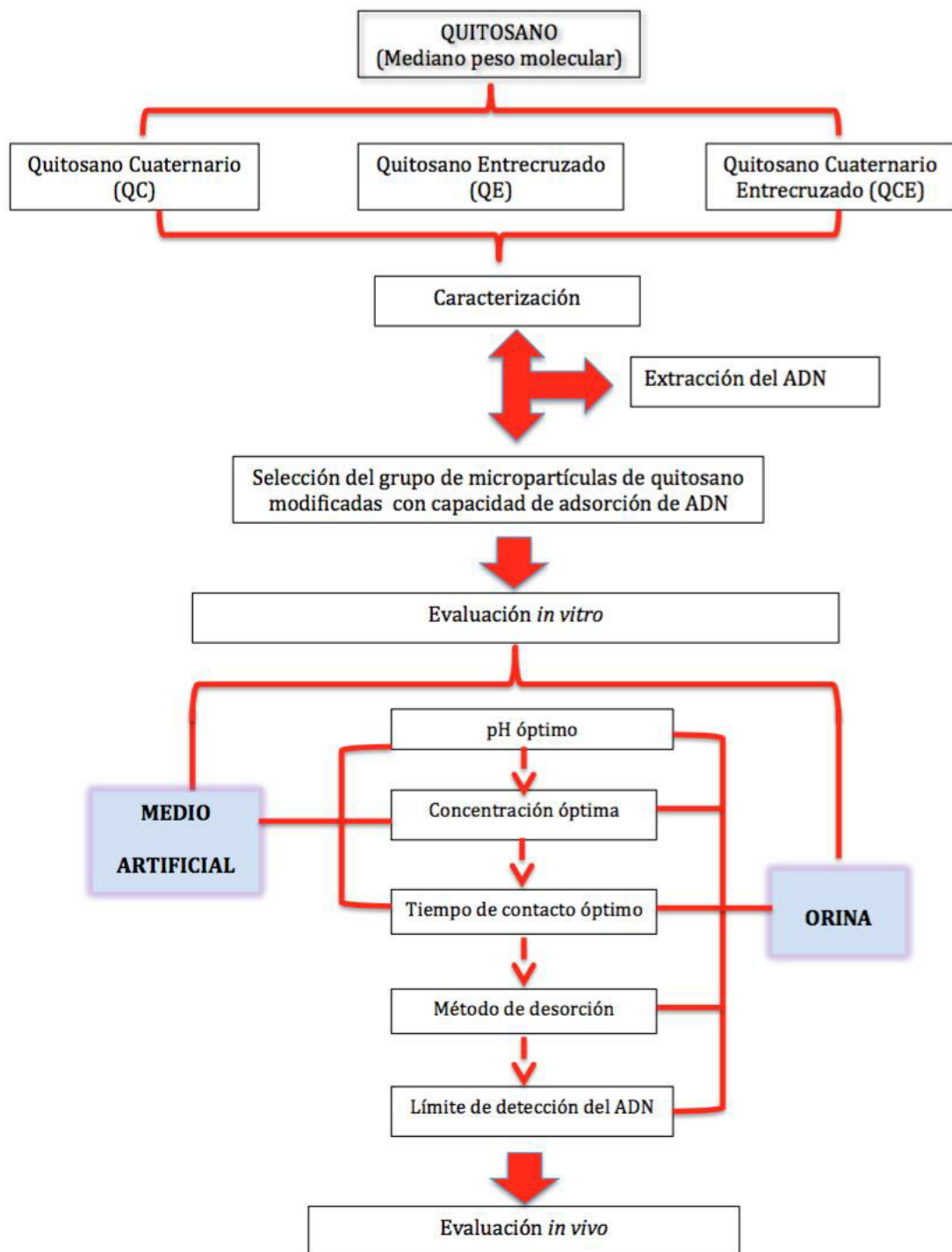


Figura 8. Flujograma experimental.

4.3. Síntesis y caracterización de micropartículas modificadas en base a quitosano

Para la síntesis de las diferentes micropartículas de quitosano se usó el quitosano de peso molecular medio (190,000-310,000 Da), los datos de procedencia y tipo se detallan en el Anexo 1.

4.3.1. Síntesis de micropartículas de quitosano cuaternario (QC)

La síntesis de micropartículas de quitosano se realizó de acuerdo a la metodología según Iparraguirre *et al.*, 2010, se dispersó 2 g de quitosano en 100 mL de agua ultrapura. Luego, para la obtención de diferentes micropartículas se agregó diferentes cantidades del agente cuaternizante glidiciltrimetilamonio (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Para QC1 se agregó 2 mL, para QC2 se agregó 2.5 mL y para el caso de QC3 se agregó 3 mL del agente cuaternizante respectivamente. Inmediatamente, se dejó bajo agitación constante por 24 horas a una temperatura de 60 °C. A continuación, el producto de la reacción se precipitó en 150 mL de acetona (JT Baker, Estados Unidos), se filtró y secó a las temperaturas de 50 °C - 60 °C en una estufa (Fisher Scientific, Estados Unidos). Posteriormente, se procedió a reducir el tamaño de las partículas mediante un mortero y finalmente fue tamizado con una malla de 150 µm (W.S. Tyler, Alemania).

4.3.2. Síntesis de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído (QE)

Para la síntesis de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído se realizó la metodología reportada por Cconislla *et al.*, 2016. La cantidad de 2 g de quitosano fue disuelta en un volumen de 150 mL de ácido acético al 2% (Merck, Alemania). El estudio estableció la variación de diferentes grados de entrecruzamiento, en el caso de QE1% se adicionó en proporción al 1%, QE5% en proporción al 5% y QE10% en proporción al 10% de Glutaraldehído (GTA) (Sigma Aldrich, Estados

Unidos), simultáneamente la mezcla se mantuvo bajo agitación constante hasta que se observó un gel. Posteriormente, se realizaron lavados con agua ultra pura (Milipore, Estados Unidos), después el gel fue secado en una incubadora a 60°C (Fisher Scientific, Estados Unidos), para luego ser molido con un mortero. Finalmente, el producto molido fue tamizado con una malla de 150 μm (W.S.Tyler, Alemania).

La síntesis para la obtención de las micropartículas de quitosano entrecruzado con la metodología antes mencionada se presenta en el Anexo 3.

4.3.3. Síntesis de micropartículas de quitosano cuaternario – entrecruzado (QCE)

Se realizó según lo reportado por Iparraguirre *et al.*, 2010. Cada micropartícula de QC fue entrecruzada con glutaraldehído a diferentes concentraciones, para ello, primero, se pesó 4 g de quitosano cuaternario se resuspendió en una solución de 100 mL de Etanol (Merck, Alemania).

Luego cada tipo de micropartícula del tipo QC1 se añadió concentraciones de GTA, obteniendo QC1-E1% con 1% de GTA , QC1-E5% con 5% de GTA y QC1-E10% con 10% de GTA (% volumen/volumen). Del mismo modo, al tipo de micropartícula QC2, se adicionó en proporción 1% de GTA obteniendo QC2-E1%, 5% de GTA para QC2- 5% y 10% GTA para QC2-E10% respectivamente. En el caso de las micropartículas QC3, se añadió concentraciones de GTA, obteniendo QC3-E1% con 1% de GTA , QC3-E5% con 5% de GTA y QC3-E10% con 10% de GTA . A continuación, cada una de ellas, se mantuvo en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente (25° C); el producto se filtró y secó a 50 - 60 °C en una estufa (Fisher Scientific, Estados Unidos). Después, se procedió a reducir el tamaño de las partículas mediante un mortero y finalmente fue tamizado con una malla de 150 μm (W.S. Tyler, Alemania), obteniendo así las micropartículas esperadas.

4.3.4. Caracterización de micropartículas de quitosano

Los espectros del quitosano se obtuvieron mediante espectroscopia infrarroja analizada en Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier– FTIR (Shimadzu, Modelo 1800).

Los fotones de radiación infrarroja son absorbidos por los enlaces de una molécula pasando a niveles vibracionales superiores. Cada tipo de enlace absorbe radiación infrarroja a una frecuencia diferente, lo que permitió determinar los tipos de grupos funcionales que posee la molécula en estudio.

La resolución espectral fue de cm^{-1} en un intervalo de regiones de 650-4000 cm^{-1} .

4.4. Evaluación *in vitro* de la adsorción – desorción del ADN usando micropartículas modificadas en base a quitosano

4.4.1. Extracción del material genético

a) ADN plasmídico

Se utilizó un plásmido pZERO-2 linealizado que contenía la secuencia de la proteína acuaporina TIP 5: 1 de *Arabidopsis thaliana* (Figura 9) donado por el Doctor Alejandro Schijman del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” - CONICET Buenos Aires, Argentina.

El procedimiento extracción del ADN plasmídico fue realizado usando el kit QIAprep Spin Miniprep, se siguió las recomendaciones del fabricante QIAGEN, donde las células bacterianas fueron resuspendidas en 250 μL de buffer P1 en un tubo de 1.5 mL. Posteriormente, se adicionó 250 μL de buffer P2 homogenizando suavemente por inversión, luego se agregó 350 μL del buffer N3 y se homogenizó cuidadosamente, la mezcla se centrifugó rápidamente a 13 000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue vertido a

minicolumnas de purificación y luego sometidas a centrifugación por 1 min, después se procedió a realizar lavados con el buffer PE seguido de centrifugación máxima, a continuación las minicolumnas se ensamblaron a tubos nuevos de 1.5 mL para eluir el ADN, la elución se realizó con la adición de 50 μ L de buffer EB (10 mM de Tris \cdot Cl, pH 8,5), se dejó 1 min en reposo y se centrifugó por 1 min.

La concentración de plásmido se determinó por espectrofotometría usando Nanodrop (Thermo Scientific, Estados Unidos). Posteriormente, el plásmido se diluyó hasta obtener una concentración final de 50 ng/ μ L, ello es equivalente a 10447243350 (10^{10}) copias/ μ L. Para determinar la curva estándar se realizó diluciones seriadas del plásmido inicial 10^{10} copias/ μ L hasta obtener la concentración igual a 10^0 copias/ μ L. Se evaluó la curva estándar a partir de las diluciones de 10^5 copias/ μ L hasta 10^0 copias/ μ L mediante qPCR realizando como mínimo tres repeticiones independientes; los valores del ciclo umbral (Cq) fueron empleados para construir la curva de calibración.



(Fuente: Invitrogen -Carlsbad, CA, USA)

Figura 9. Esquema del plásmido pZERO-2

b) ADN de *Trypanosoma cruzi*

Se trabajó con epimastigotes de una cepa Y de *T. cruzi* mantenida en cultivo en el laboratorio del LIEI – UPCH, la cual fue donada por la Dra. Eufrosina Umezawa (Instituto de Medicina Tropical, Universidad de São Paulo, Brasil) identificado como genotipo II (*T. cruzi* II).

El número de parásitos se determinó con ayuda de una cámara de Neubauer, el criterio de elección fue morfológico y por el tipo de movimiento de los parásitos. La cepa fue diluida en solución de PBS para obtener 10^6 parásitos (epimastigotes) equivalentes por mililitro (p/mL), considerando que 1 parásito contiene 200 fg de ADN (Duffy *et al*, 2009).

Para obtener el ADN, se empleó el kit comercial de extracción y purificación de ADN genómico QIAamp DNA Mini Kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante (QIAGEN), al contenido de los parásitos se adicionó 20 μ L de Proteinasa K y 200 μ L de buffer AL, luego se sometió a vórtex vigorosamente por 15 – 30 seg, después se procedió a incubar en baño seco (estufa) a 56 ° C por 30 min, transcurrido ese tiempo se añadió 200 μ L de Etanol al 100% y se agitó con un vórtex durante 15 – 20 seg. La mezcla fue colocada en una minicolumna y centrifugada a una velocidad de 13 000 rpm por 1 min, esta solución libre de ADN fue descartada en el tubo de colección. Se realizó lavados colocando la minicolumna en un tubo nuevo de colección, se agregó 500 μ L del tampón de lavado 1 (AW1) e inmediatamente se centrifugó a 10 000 rpm por 1 min, se repitió el lavado usando el tampón de lavado 2 (AW2), descartando la suspensión en el tubo de colección y se colocó nuevamente la minicolumna en un tubo estéril de 1.5 μ L, se adicionó 50 μ L de tampón de elución - AE e incubó por 1 min, luego se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min y se colectó del ADN eluido.

El ADN obtenido fue diluido 1:10 en buffer AE del kit, desde 10^5 hasta 10^{-1} parásitos/mL. El ADN se almacenó a – 20°C hasta su uso.

4.4.2. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

a) ADN plasmídico (IAC)

Para la amplificación se empleó los oligonucleótidos IAC Fw: a 5' ACCGTCATGGAACAGCACGTA 3' (Invitrogen, Estados Unidos) e IAC Rv: 5' CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT 3' (Invitrogen, Estados Unidos), respectivamente y la sonda Taqman IAC Tq cuya secuencia corresponde a 5' AGCATCTGTTCTTGAAGGT 3' marcada en el extremo 5' y 3' con 6-carboxifluoresceína (FAM) y un ligando de unión al surco menor del ADN (MGB) (Invitrogen, Estados Unidos) (Duffy *et al.*, 2009).

El mix para la amplificación del PCR consistió de 1X de FastStart Universal Probe Master (Rox), 10 µM de cada oligonucleótido, 5 µM de sonda y 5 µL de muestra de ADN. La amplificación se realizó empleando el termociclador Light Cycler 96 empleando el siguiente perfil de amplificación: 95°C por 10 min, 40 ciclos cada uno consistente de 15 seg. a 95°C y 1 min a 58°C (Duffy *et al.*, 2009).

b) ADN de *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*)

Se realizó la amplificación de diferentes secuencias diana del ADN de *T. cruzi*, de acuerdo a la región de interés (Tabla 1), para ello se realizó 02 pruebas de qPCR empleando dos diferentes oligonucleótidos: uno dirigido a la región del ADN satélite (ADNsat) - C3 y otro dirigido al ADN del kinetoplasto (ADNk) - 71P marcadas con distintos fluoróforos, ambas pruebas se encuentran validadas para la cuantificación de *T. cruzi* (Piron *et al.*, 2007; Schijman *et al.*, 2011; Qvarnstrom *et al.*, 2012).

Para amplificar la región del ADNsat – C3, se utilizó los oligonucleótidos Cruzi1 (C1) / Cruzi2 (C2) cuyas secuencias corresponden a 5'–ASTCGGCTGATCGTTTTCGA–3' y 5'–AATTCCTCCAAGCAGCGGATA–3'

(Invitrogen, Estados Unidos), respectivamente, el producto amplificado tuvo un tamaño de 166 pb. La sonda cruzi 3 (C3) cuya secuencia corresponde a 5'-CACACACTGGACACCAA-3' fue marcado con 5'FAM (6-carboxifluoresceína) y 3'MGB (minor Groove binder) (Invitrogen, Estados Unidos).

Para amplificar la región del ADNk – 71P, se emplearon los oligonucleótidos 32F/148R cuyas secuencias corresponden a 5'-TTTGGGAGGGGCGTTCA-3' y 5'-ATATTA CACCAACCCCAATCGAA-3', respectivamente, el producto amplificado tuvo un tamaño de 118 pb. La sonda LNA 71P cuya secuencia corresponde a 5'-CATCTCACCCGTACATT-3' fue marcado con 5'FAM (6-carboxifluoresceína) y 3'HBQ1 (Hole Black Quencher 1) (Invitrogen, Estados Unidos).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos usados en el qPCR para la detección de ADN de *T. cruzi*.

<i>T. cruzi</i>	Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Tamaño de amplificación (pb)
ADN satélite (ADNsat)	Cruzi 1 (C1)	5'-ASTCGGCTGATCGTTTTCGA-3'	166
	Cruzi 2 (C2)	5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'	
	Cruzi 3 (C3)	5'-CACACACTGGACACCAA-3' (Sonda)	
ADN del kinetoplasto (ADNk)	32 F	5'-TTTGGGAGGGGCGTTCA-3'	118
	148 R	5'-ATATTACACCAACCCCAATCGAA-3'	
	71P	5'-CATCTCACCCGTACATT-3' (Sonda)	

pb: pares de bases

El mix de PCR empleado para la amplificación de ambas regiones consistió de 1X FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche, Suiza), 0.75 μ M de cada cebador, 0.05 μ M de la sonda TAQMAN y 5 μ L de muestra de ADN (Anexo 3) en un volumen final de 20 μ L. La placa de 96 pozos es llevada a microcentrifugación (Anexo 3). La reacción de amplificación se realizó empleando un termociclador Light Cycler 96 [®] (Roche, Suiza) usando el protocolo de ciclado adaptado de Schijman *et al.* (2011) con las condiciones descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones del ciclado del qPCR para la detección de ADN de *T. cruzi*.

Cantidad de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10 min
45	95 °C	15 seg
	58 °C	1 min
1	72 °C	1 min

4.4.3. Selección del grupo de micropartículas de quitosano modificadas con capacidad de adsorción de ADN

Se evaluaron 15 diferentes muestras de micropartículas modificadas en base a quitosano distribuidas en tres grupos según la modificación química antes mencionada, se continuo con el siguiente procedimiento (Figura 10):

- Se pesó 5 mg de cada muestra de micropartícula de quitosano (Figura 32).
- A cada muestra de micropartícula se añadió un volumen de un tampón como medio de resuspensión y/o disolución.
- Se añadió 50 ng de ADN plasmídico y se mezclaron usando un homogeneizador rotario de 360° por un tiempo de 60 min (Figura 34).
- Se separaron las micropartículas a máxima centrifugación con una velocidad de 21 000 g por 30 min.
- El sobrenadante (libre de ADN) fue llevado a un tubo estéril de 1.5 mL y preservado a -20 °C.
- El complejo formado por las micropartículas de quitosano–ADN (*pellet*) permaneció en el tubo inicial.
- Se adicionó el tampón detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) para la desorción del ADN y se dejó en movimiento rotario por 15 min.
- Se sometió a extracción del ADN mediante la técnica conocida “fenol – cloroformo”.
- El ADN purificado fue preservado – 20°C, para su próxima evaluación por PCR.

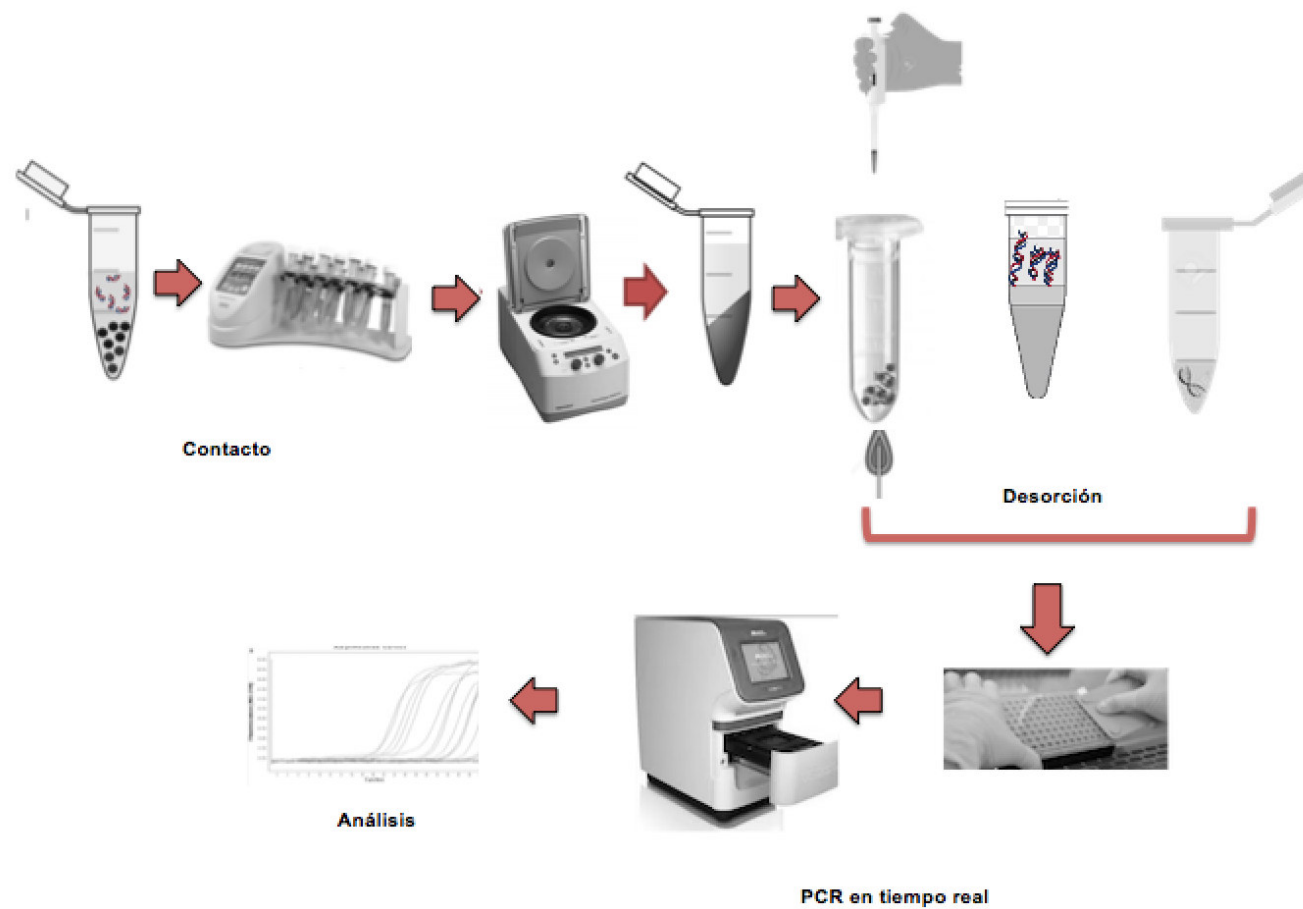


Figura 10. Procedimiento general de adsorción – desorción de ADN usando micropartículas modificadas de quitosano.

De los tres diferentes grupos de muestras de micropartículas de quitosano, en primer lugar, se seleccionó el grupo cuyo resultado por PCR en tiempo real mostró valores menores de Cq (ciclo umbral), entendiendo que el valor de Cq es considerado como “inversamente proporcional a la cantidad de ADN”, por esa razón, el valor de Cq se usó para determinar el grupo que tiene mayor capacidad de capturar el ADN. En segundo lugar, al grupo mencionado se le realizó una nueva evaluación siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y finalmente se seleccionó una única muestra de micropartícula con la más alta y/o máxima capacidad de adsorción de ADN, en este sentido, la muestra de micropartícula elegida será usada para continuar los próximos ensayos.

4.4.4. Pre-tratamiento de las muestras de orina

- Inmediatamente después de la colecta de la muestra se mantuvieron en cadena de frío hasta el lugar de almacenamiento (Figura 33).
- Se midió el pH inicial de la orina
- Para eliminar las células epiteliales, bacterias se centrifugó a 3000 rpm x 20 min.
- Inmediatamente se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos
- Se conservó la muestra a -70°C por tiempo indefinido.

4.4.5. Determinación del pH óptimo para la adsorción de ADN usando micropartículas de quitosano

Con el fin de determinar si el pH tiene efecto en la formación de complejos quitosano – ADN se analizaron experimentos variando valores de pHs, para ello se usaron medios artificiales y orina.

Para los ensayos con medio artificial, se usó tres diferentes pH en tampones específicos: ácido 2, morfolino–etanosulfónico (MES, 20 mM, pH 5), ácido 2, morfolino–etanosulfónico (MES, 20 mM, pH 6), tampón fosfato salino (PBS, 20 mM, pH 6,9), se confirmó la medida del pH mediante un pH metro (Mettler Toledo, Estados Unidos).

Para los ensayos con orina, se calibró el pH de alícuotas de 15 mL de la orina (previamente tratada) a pH 5 – 6 - 6.9 empleando ácido clorhídrico 0.1 M.

Posteriormente, se realizó alícuotas de 1mL a las que se adicionaron 50 ng de ADN plasmídico. A cada alícuota se añadió micropartículas de quitosano a concentración de 5 mg/mL. Luego, se continuó con el procedimiento general antes mencionado para finalmente evaluar si el pH afecta en la cantidad de ADN adsorbido y determinar el pH con mejor capacidad de adsorción de ADN.

4.4.6. Concentración óptima de micropartículas de quitosano para la captura de ADN

Con el objeto de determinar la cantidad óptima de micropartículas de quitosano con mayor capacidad de adsorción de ADN, que logre recuperar la máxima cantidad de ADN del medio, fue necesario evaluar si el volumen de muestra afecta la adsorción de ADN, por lo cual, se procedió a realizar 02 diferentes experimentos:

a) En volumen a escala de 1 mL:

Se pesaron las micropartículas de quitosano a diferentes concentraciones en el medio artificial de pH 6.9: 1.5 mg/mL, 3 mg/mL, 6 mg/mL. A cada una de ellas se agregó 50 ng de ADN para continuar con el esquema general del procedimiento.

b) En volumen a escala de 10 mL:

Con este propósito se evaluaron 3 diferentes concentraciones de micropartículas (1.5 mg/mL – 3 mg/mL – 6mg/mL) en un volumen de 10 mL de orina. A cada muestra se adicionó 50 ng de ADN plasmídico (IAC) para posteriormente continuar con el esquema general del procedimiento.

4.4.7. Tiempo de contacto óptimo entre las micropartículas de QE al 1% y ADN

Para evaluar si existe influencia del tiempo de contacto entre el ADN y micropartículas para la captura de ADN, se estableció evaluar 4 tiempos diferentes de interacción para la formación de estos complejos de micropartículas de quitosano – ADN: 30 min – 60 min – 90 min y 120 min.

4.4.8. Métodos de desorción del ADN de las micropartículas de quitosano en orina

La orina por ser una muestra biológica con diferentes componentes (sales orgánicas e inorgánicas, bacterias) que pueden influir sobre la desorción del complejo ADN-Quitosano, se ha evaluado los métodos de desorción para lograr obtener la mayor cantidad de ADN y así realizar el PCR. Por esta razón, se evaluó 4 diferentes tampones como: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB), Agua, EDTA a pH 8 y SDS al 10% como pre-tratamiento para la desorción del complejo micropartículas de quitosano – ADN antes de la extracción por el método fenol-cloroformo. El complejo micropartículas de quitosano – ADN (*pellet*) se resuspendió en cada tampón antes descrito e incubó a temperatura ambiente en agitación constante durante 30 min. Posteriormente los tubos conteniendo el *pellet* de micropartículas fueron colocados en un baño seco a 90°C por 30 min para así, facilitar la desorción por temperatura. Finalmente el *pellet* de micropartículas fue sometido a un tratamiento con fenol- cloroformo para la desorción del ADN.

Las muestras de ADN extraídas con fenol-cloroformo fueron analizadas mediante qPCR.

4.4.9. Límite de detección de ADN usando micropartículas de quitosano

a) ADN plasmídico (IAC)

Para evaluar límite de captura de ADN plasmídico usando las micropartículas de quitosano, se realizaron alícuotas de 1 mL de orina previamente tratada y se dividieron en dos grupos de evaluación.

Un primer grupo de muestras de orina (1mL) fue contaminado con diferentes concentraciones de ADN plasmídico que van desde 10^0 hasta 10^5 copias/mL, se dejaron en agitación constante mediante un rotor (Bio RS-24, BIOSAN, USA) a 40 rpm, por un tiempo de 60 min, posterior a ello se comenzó la extracción de ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo.

Un segundo grupo de muestras de orina (1mL) fue contaminado también con una determinada cantidad de copias de plásmido, desde 10^0 hasta 10^5 copias/mL, a continuación se agregó una cantidad de micropartículas y se dejó en agitación rotatoria por 60 min, posteriormente se continuó con la metodología antes mencionada para la desorción del ADN.

De esta forma, se obtuvo el ADN obtenido por ambos grupos de forma comparativa y evaluar si el uso de micropartículas son capaces de concentrar el ADN plasmídico.

b) ADN de *T. cruzi*

Para la determinación del límite de detección de ADN de *T. cruzi*, también se realizó alícuotas de 1 mL de orina previamente tratada y se dividieron en dos grupos de evaluación.

Un primer grupo de muestras de orina (1mL) fue contaminado con diferentes cantidades de parásitos de *T. cruzi* que van desde 10^{-1} hasta 10^5 parásitos/mL, se dejaron en agitación constante en un rotor (Bio RS-24,

BIOSAN, USA) a 40 rpm por un tiempo de 60 min, posterior a ello se comenzó la extracción de ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo.

Un segundo grupo de muestras de orina (1mL) fue contaminado también con una determinada cantidad de parásitos de *T. cruzi*, desde 10^{-1} hasta 10^5 parásitos/mL, a continuación se agregó micropartículas de quitosano y al igual que el experimento anterior, se prosigue en paralelo ambos grupos, dejándolos en agitación rotatoria constante por 60 min, posteriormente se continuó con la metodología mencionada anteriormente para la desorción de ADN.

Como consecuencia, se puede obtener datos comparativos entre ambos grupos y determinar si las micropartículas de quitosano son capaces de concentrar el ADN sea plasmídico y/o de *T. cruzi* añadido artificialmente a la orina y también establecer el límite de detección.

4.5. Evaluación *in vivo* de la sensibilidad y especificidad del uso de micropartículas de quitosano modificadas para el diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi* en orina

Se logró obtener muestras de orina en volumen ≥ 10 mL preservadas en una congelación (-70°C) en un periodo aproximado de 2 años, la procedencia de las muestras fueron de un estudio de modelo animal en *Cavia porcellus* (cuy) (Castro-Sesquen *et al.*, 2011).

Las muestras se clasificaron en dos grupos (Tabla 3):

- a) Casos. Estuvo conformado por muestras de orina de cuyes infectados experimentalmente, estas muestras se obtuvieron a los 14 dpi (días post infección) y a los 45 dpi, el diagnóstico positivo fue confirmado por examinación parasitológica.

- b) Controles. Estuvo conformado por 13 muestras de orina, el diagnóstico negativo fue confirmado por examinación parasitológica.

Tabla 3. Clasificación de casos y controles del modelo animal *Cavia porcellus*.

CASOS		CONTROLES
14 <i>dpi</i>	45 <i>dpi</i>	
<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 13
<i>n</i> = 28		

Las muestras fueron pre-tratadas y se realizó el protocolo en las condiciones estandarizadas indicado en el Anexo 2.

4.6. Análisis estadísticos

Todos los datos fueron analizados usando el paquete de software disponible STATA IC 12.0.

Para determinar la influencia de factores como pH, concentración, tiempo de contacto de formación del complejo y método de desorción, se determinó el supuesto de normalidad y homogeneidad, posteriormente se aplicó para la comparación entre grupos el análisis de varianza (ANOVA), en los casos que no se cumplieron el supuesto de normalidad, se definió aplicar la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

Valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Se utilizó la prueba de regresión lineal para la determinación de la curva estándar mediante determinación del coeficiente de Pearson (R^2).

El análisis descriptivo fue realizado mediante tablas y porcentajes. Para la validación de la prueba usando micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%, se calculó la sensibilidad y especificidad, así como valores predictivos positivo y negativo. Estos se obtuvieron mediante una tabla 2 x 2 (Tabla 4) comparando los resultados del qPCR a validar con los resultados de referencia a partir de animales experimentalmente infectados con *T. cruzi* y no infectados.

Tabla 4. Tabla 2 x 2 de cálculo para evaluar la sensibilidad y especificidad

		Resultados de Referencia	
		+	-
qPCR a evaluar	+	a	b
	-	c	d

Donde “a” representa el número de verdaderos positivos, “b” de los falsos positivos, “c” de los falsos negativos y “d” de los verdaderos negativos. Con estos datos se obtuvo los datos para evaluar la calidad del qPCR usando micropartículas de QE al 1%.

- La sensibilidad, proporción de verdaderos positivos identificados por la prueba del total de sueros positivos. Se calcula con la formula siguiente, **$S = a/a+c$** .
- La especificidad, proporción de verdaderos negativos identificados por la prueba del total de sueros negativos. Se calcula con la formula **$E = d/b+d$** .

La tabla también nos permitió determinar los valores predictivos de la técnica:

- El Valor Predictivo Positivo es la proporción de sujetos verdaderamente positivos entre los que dieron positivo en la prueba. **$VP+ = a/a+b$**
- El Valor Predictivo Negativo es la proporción de sujetos verdaderamente negativos entre el total de los que dieron negativo en la prueba. **$VP- = d/c+d$**

V. RESULTADOS

5.1. Síntesis y caracterización de micropartículas modificadas en base a quitosano

5.1.1. Síntesis de micropartículas modificadas en base a quitosano

Se logró sintetizar 15 diferentes tipos de micropartículas modificadas en base a quitosano de mediano peso molecular (Figura 11).

La adición al quitosano de un agente cuaternizante (cloruro de glicidiltrimetilamonio) a diferentes cantidades, resultó en la síntesis de tres micropartículas: QC1, QC2, QC3

El entrecruzamiento del quitosano con glutaraldehído a diferentes concentraciones dio como resultado la síntesis de otras tres micropartículas de quitosano: QE1%, QE5%, QE10%.

Finalmente, a cada micropartícula cuaternizada posteriormente se le añadió el entrecruzante glutaraldehído en diferentes porcentajes anteriormente mencionados, obteniéndose otras 9 micropartículas cuaternizadas entrecruzadas: QC1-E1%, QC1-E5%, QC1-E10%, QC2-E1%, QC2-E15%, QC2-E10%, QC3-E1%, QC3-E15%, QC3-E10%.

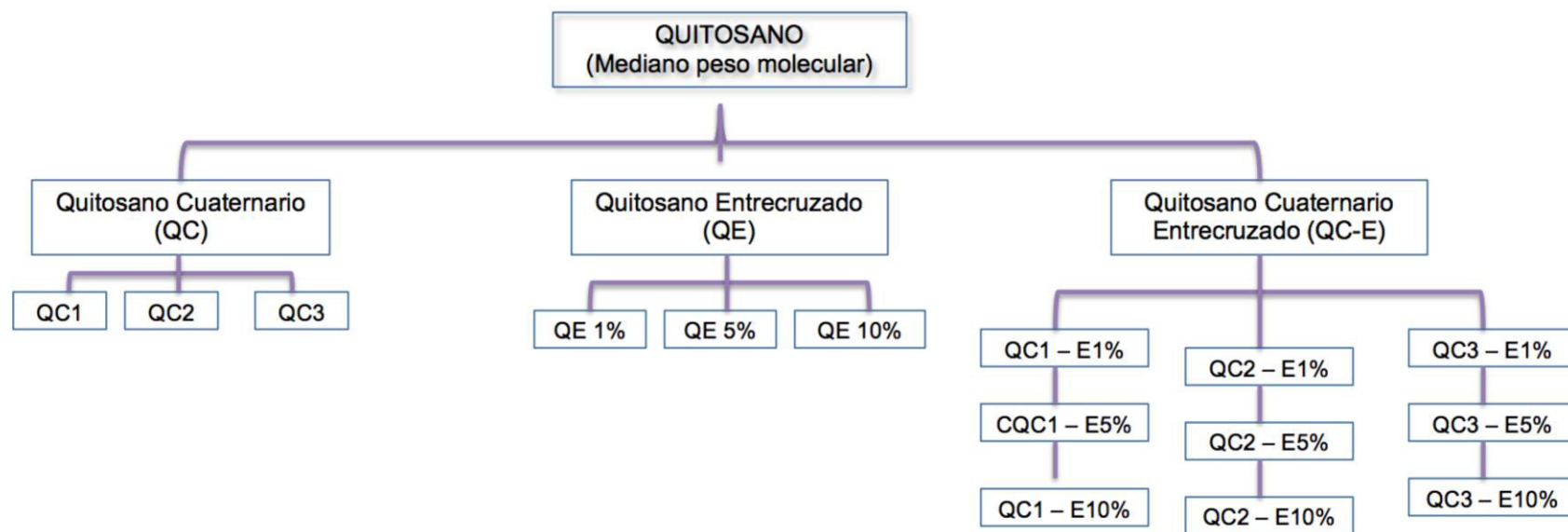


Figura 11. Diferentes tipos de micropartículas modificadas en base a quitosano.

5.1.2. Caracterización de micropartículas

5.1.2.1. Micropartículas de quitosano cuaternario (QC)

Las tres (03) micropartículas de quitosano cuaternizadas modificadas con el agente cuaternizante (cloruro de glicidiltrimetilamonio) fueron caracterizadas.

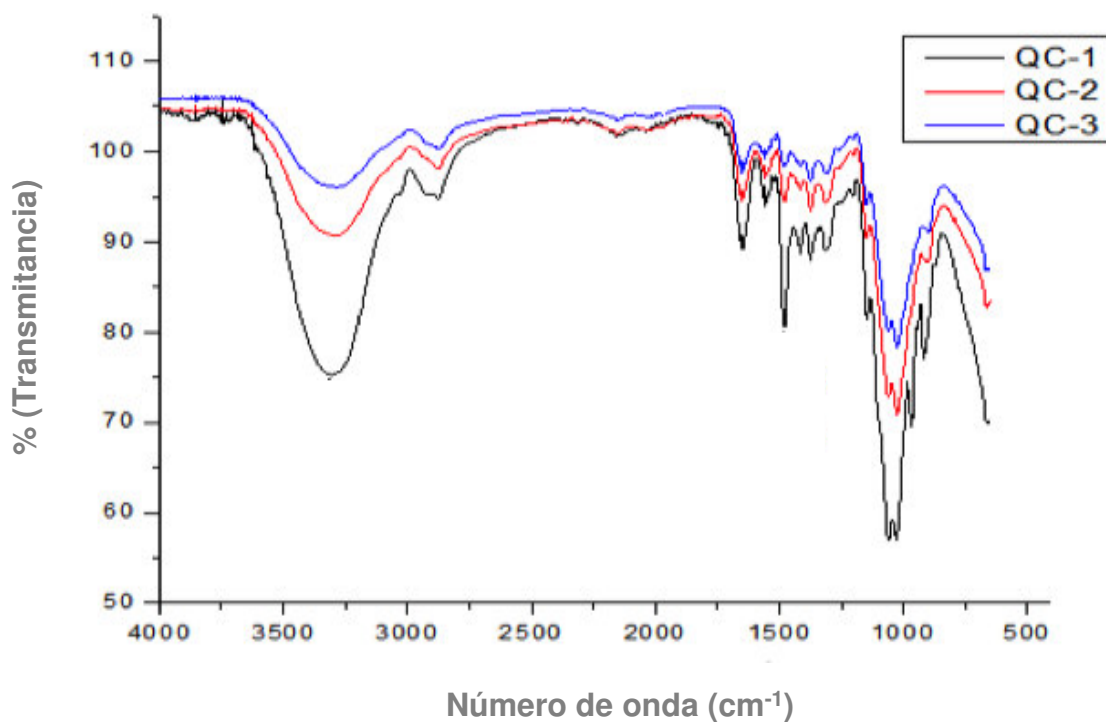


Figura 12. Espectros FTIR de quitosano cuaternario.

En la Figura 12, se muestran los espectros FTIR, nótese que en este tipo de modificación, aparece una señal en la región entre 1471 cm⁻¹ a 1485 cm⁻¹ que corresponde a los grupos metilos del nitrógeno de la amina cuaternaria, adicionalmente se observó la reducción inversamente proporcional en la región 3300 cm⁻¹.

5.1.2.2. Micropartículas de quitosano entrecruzado (QE)

Las 3 micropartículas de quitosano modificadas con agente entrecruzante (glutaraldehído) fueron caracterizadas.

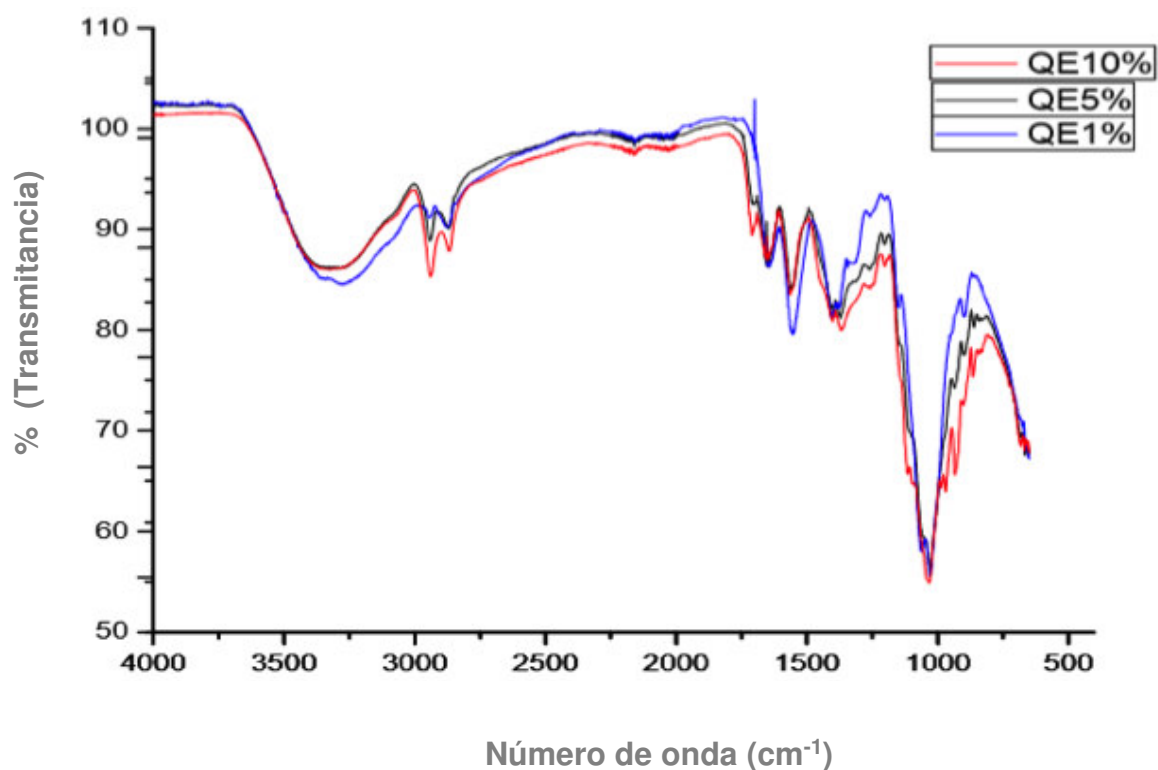


Figura 13. Espectros FTIR de quitosano entrecruzado.

En la Figura 13, se observa el espectro de los grupos funcionales de las tres micropartículas sintetizadas en base a la adición de un entrecruzante glutaraldehído, se evidencia la modificación en la región de 1363 cm⁻¹ y 1155 cm⁻¹ como producto de la reticulación y al final de la reacción a 1635 cm⁻¹ se observó el grupo imino formado al entrecruzar el quitosano con glutaraldehído.

5.1.2.3. Micropartículas de quitosano cuaternario entrecruzado (QCE)

Las micropartículas de quitosano cuaternizadas entrecruzadas fueron caracterizadas para evidenciar la modificación por el agente cuaternizante y el agente entrecruzante.

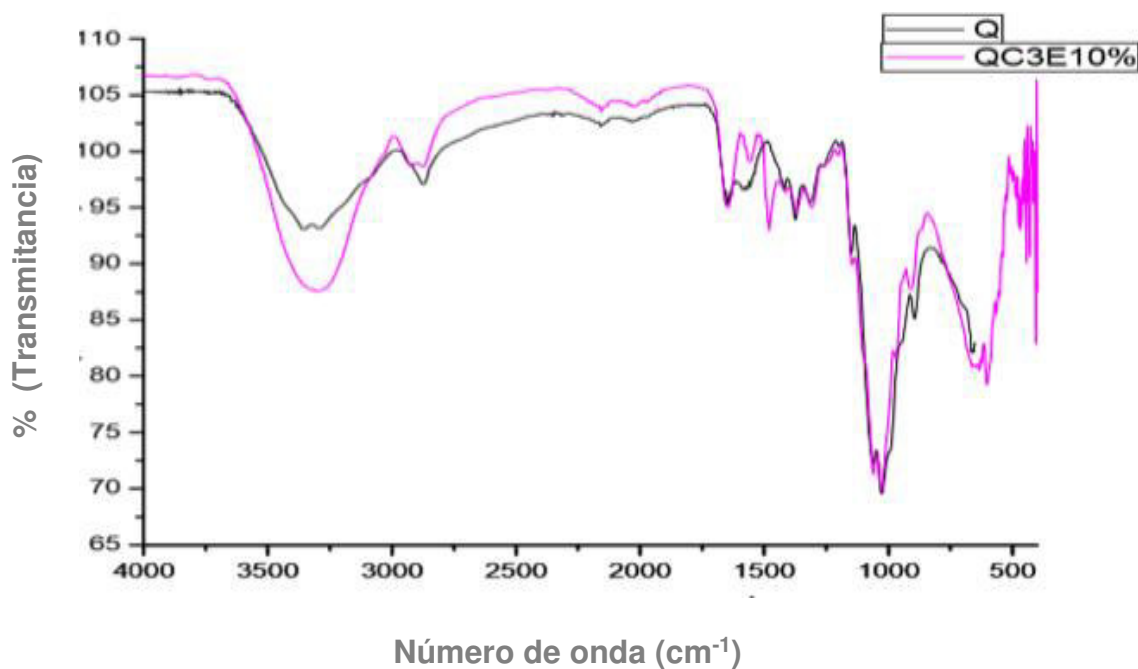


Figura 14. Espectros FTIR de quitosano cuaternario entrecruzado.

En la Figura 14, se evidencian los picos correspondientes a los grupos químicos de las micropartículas de quitosano cuaternizado con 3 mg de cuaternizante (QC3) y con 10 % de glutaraldehído, básicamente conserva las modificaciones por cada tipo de modificación anteriormente mencionadas, por ende cada modificación actúa de forma independiente, así también, el incremento de concentración de agente cuaternizante y/o porcentaje de entrecruzante incrementa los picos de estas modificaciones.

5.2. Evaluación *in vitro* de la adsorción – desorción del ADN usando micropartículas modificadas en base a quitosano

5.2.1. Aislamiento de material genético

a) ADN plasmídico (IAC)

En las diferentes diluciones realizadas anteriormente con el ADN plasmídico se realizó un PCR en tiempo real para confirmar la presencia de ADN.

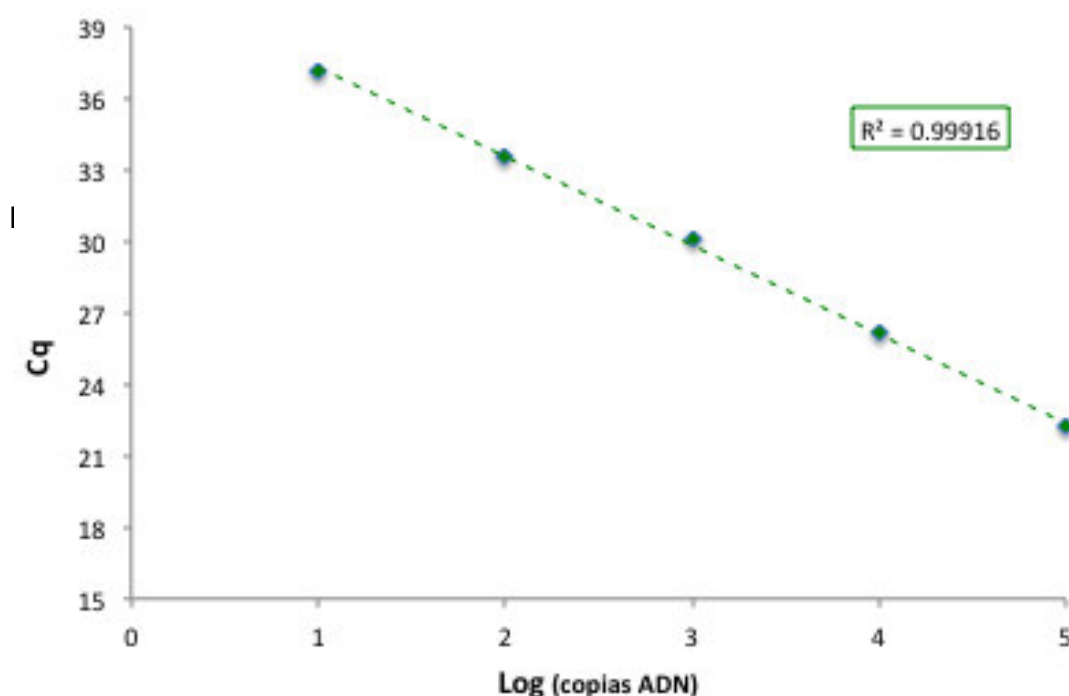


Figura 15. Curva estándar construida con el número de copias del plásmido. En el eje Y se encuentra el ciclo de cuantificación (Cq), o ciclo en que la señal de fluorescencia cruzó el umbral de detección, y en el eje X se encuentra la cantidad de ADN expresada en logaritmo de copias de ADN/mL. R²: coeficiente de Pearson. QE1%: Micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.

En la Figura 15, se puede observar la amplificación de las diluciones usadas para la construcción de la curva estándar del ADN plasmídico, se determinó el límite mínimo de amplificación fue de 10¹ copias/mL que corresponde a un Cq igual a 37.14. Diluciones menores no presentaron amplificación, siendo consideradas negativas. El valor del Coeficiente de determinación (R²) fue de 0.99916.

b) ADN de *T.cruzi*

En las diferentes diluciones realizadas anteriormente con el ADN de *T. cruzi* se realizó un PCR en tiempo real para confirmar la presencia de ADN.

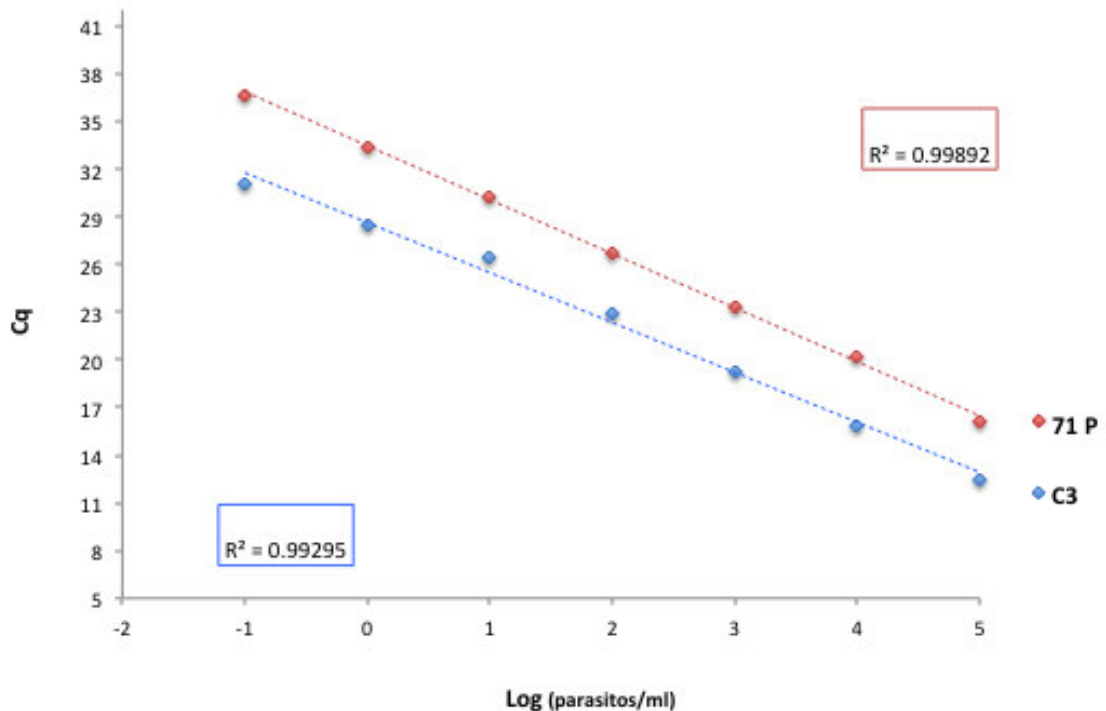


Figura 16. Curva estándar construida con el número de parásitos/mL. En el eje Y se encuentra el ciclo de cuantificación (Cq), o ciclo en que la señal de fluorescencia cruzó el umbral de detección, y en el eje X se encuentra la cantidad de ADN expresada en logaritmo de copias de parásitos/mL. La línea en rojo representa la amplificación de la región de ADN satélite (ADNsát) - C3 de *T. cruzi* y la línea azul representa la amplificación de la región de ADN del kinetoplasto (ADNk) - 71P de *T. cruzi*. R²: coeficiente de Pearson. QE1%: Micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.

En la Figura 16, se observa la amplificación de las diluciones usadas para la construcción de la curva estándar del ADN de *Trypanosoma cruzi* desde 10^5 a 10^2 parásitos/mL. La amplificación del fragmento de 166 pb corresponde al ADNsát (C3) y el fragmento de 118 pb corresponde al ADNk (71P) de *T. cruzi*, para ambos fragmentos el límite mínimo de amplificación fue de 10^{-1} parásitos/mL, siendo el valor del R² de 0.99892 y 0.99295 respectivamente.

5.2.2. Selección del grupo con capacidad de adsorción del ADN

Se realizó un PCR en tiempo real de las micropartículas de quitosano modificadas químicamente para determinar la capacidad de adsorción de ADN.

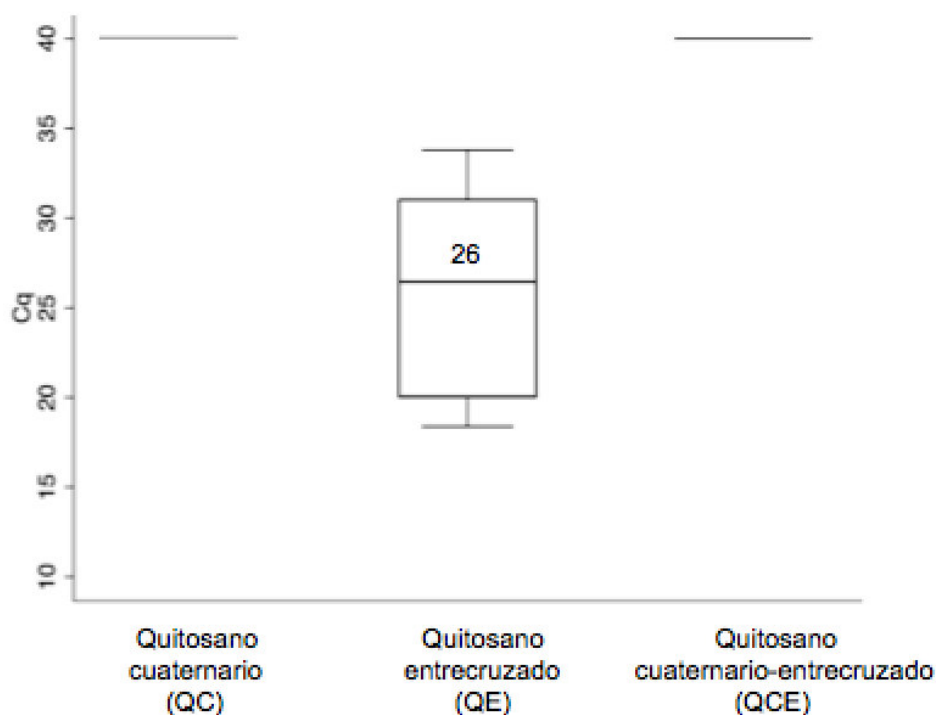


Figura 17. Evaluación de diferentes tipos de micropartículas modificadas de quitosano. Valores de Cq obtenidos por PCR en tiempo real del ADN plasmídico usando diferentes micropartículas de quitosano. Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, $p=0.0001$. Cq: ciclo de cuantificación.

En la Figura 17, se puede evidenciar los resultados del valor de Cq (ciclo de cuantificación) detectado por cada grupo de micropartículas modificadas, los valores de Cq permitió evidenciar que la cantidad de ADN es mayor usando el grupo de las micropartículas de QE ($Cq=26$) en comparación con el grupo de micropartículas de QC ($Cq \geq 40$) y las micropartículas de QCE ($Cq \geq 39$), por ende, se demostró que existe diferencia significativa entre los grupos de micropartículas modificadas ($p \leq 0.05$), por lo que, se determinó la eficiencia de las micropartículas de QE para la captura de ADN y se procedió a continuar con este grupo de

micropartículas para la evaluación de los próximos parámetros con el objetivo de optimizar y mejorar los resultados obtenidos.

Después de determinar que las micropartículas QE poseen una mayor capacidad de adsorber el ADN comparada a las otras micropartículas, se analizó los diferentes tipos de micropartículas entrecruzadas sintetizadas en base al porcentaje (%) del agente entrecruzante.

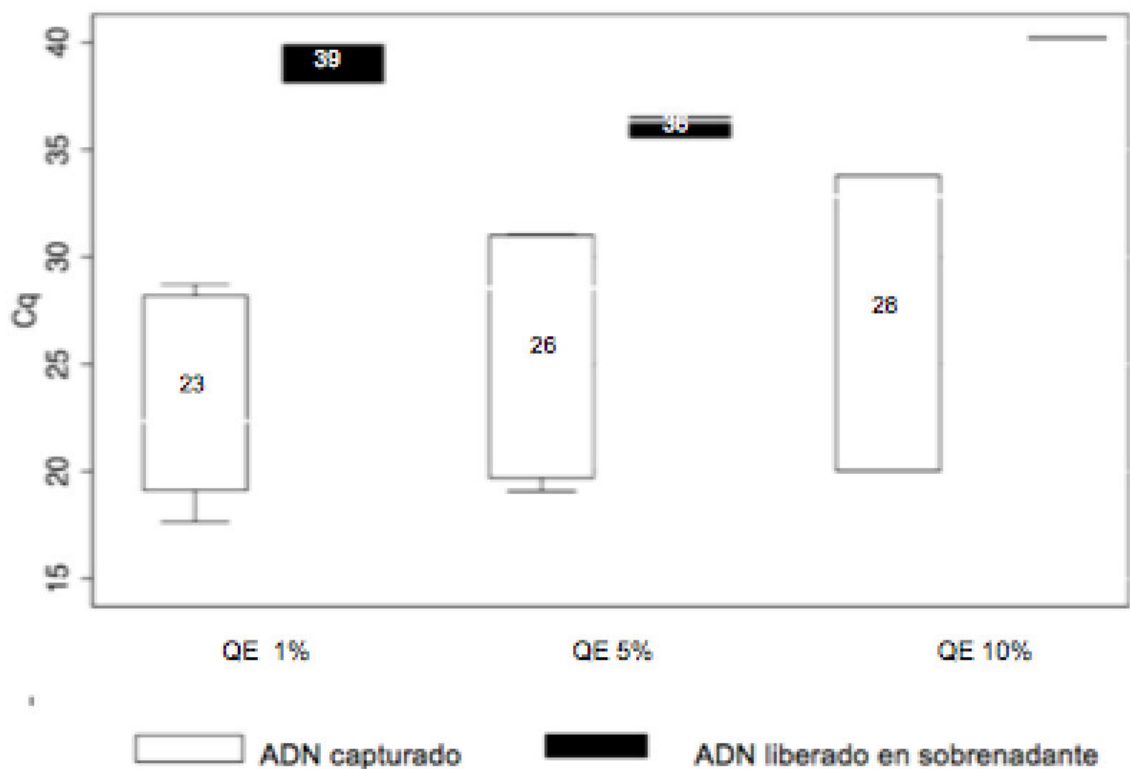


Figura 18. Evaluación de tres diferentes micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído. Valores de Cq obtenidos por PCR en tiempo real del ADN plasmídico usando diferentes micropartículas de quitosano. El grupo de ADN capturado y ADN liberado en sobrenadante se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, $p = 0.0001$. Cq: ciclo de cuantificación.

QE1%: Quitosano entrecruzado al 1 %,
 QE5% : Quitosano entrecruzado al 5%
 QE10%; Quitosano entrecruzado al 10 %

En la Figura 18, se aprecia el valor de Cq detectado por cada tipo de micropartículas de QE y el valor de Cq del sobrenadante de cada una de ellas, los resultados demuestran que existe diferencia estadísticamente significativa entre ADN liberado en el sobrenadante y ADN capturado por las micropartículas de QE ($p \leq 0.05$).

Adicionalmente, el análisis de los valores Cq de las micropartículas de QE al 1%, 5% y 10 % con glutaraldehído, confirmó la capacidad de captura del ADN, sin embargo no existe diferencia significativa entre ellas ($p \geq 0.05$), por lo tanto, son los valores de la mediana de Cq que permitió evidenciar que las micropartículas de QE al 1% presentaron la máxima capacidad de captura de ADN (Cq= 22) en comparación con las micropartículas de QE al 5% (Cq=29) y las micropartículas de QE al 10% (Cq=33), de la misma forma, se evidenció que el sobrenadante de las micropartículas de QE al 1% no se detectó el ADN (Cq > 38.6), por esta razón, se seleccionó esta micropartícula para continuar los próximos ensayos.

5.2.3. Determinación del pH del medio para la adsorción de ADN

Se evaluó diferentes valores de pH del medio para determinar el pH óptimo en la captura de ADN usando micropartículas de QE al 1%.

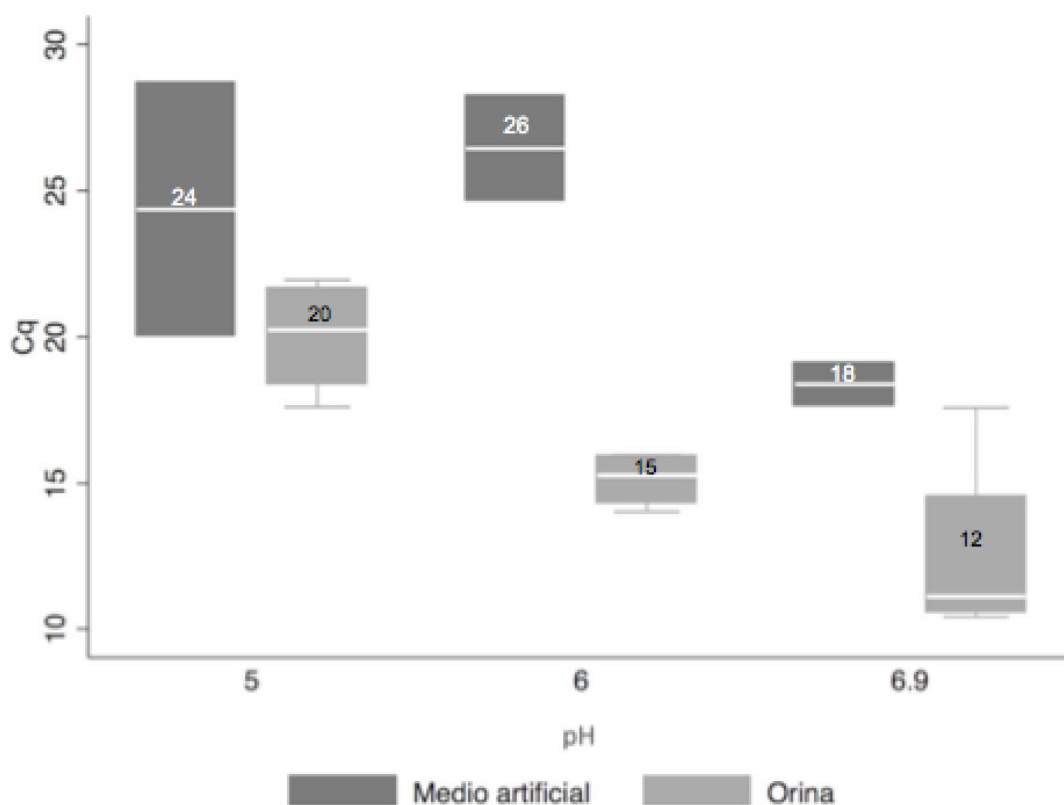


Figura 19. Efecto de la modificación del pH en medio artificial y orina sobre la adsorción de ADN por micropartículas QE1%. Valores de Cq obtenidos por PCR en tiempo real del ADN plasmídico usando diferentes pHs. Se realizó la comparación mediante prueba de Kruskal-Wallis, en medio artificial ($p= 0.18$) y en orina ($p=0.004$). Cq: ciclo de cuantificación.

En la Figura 19, se observó los valores de Cq del PCR en tiempo real de las micropartículas de QE al 1% a diferentes pH (5 – 6- 6.9) en medios artificiales y orina. Al evaluar los resultados de los valores de Cq entre los medios artificiales y orina presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

El análisis de los resultados del factor del pH en medio artificial, no se encontró diferencia significativa entre los diferentes grupos de pHs ($p \geq 0.05$), sin embargo se demostró que el ADN fue capturado por las micropartículas de QE1% con valores de Cq entre 18.4 - 24.4, se consideró al medio artificial de pH 6.9 con mayor capacidad de captura de ADN (Cq=18.4).

Respecto a los análisis en orina, se observó efectos estadísticamente significativos entre los tres diferentes grupos de pH regulado ($p \leq 0.05$), demostrando la captura de ADN con valores de Cq entre 12.6 – 20. La orina con pH regulado de 6.9 demostró la capacidad máxima de captura de ADN (Cq=12.6).

En ambos ensayos el pH del medio de 6.9 logró la máxima capacidad de captura del ADN. Adicionalmente, se observó diferencia significativa de los resultados frente al pH, el grupo a pH 5 mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) frente a los otros dos grupos de pH 6 y 6.9 con un Cq promedio de 21.46, el grupo a pH 6 no presentó diferencia ($p \geq 0.05$) frente a los otros dos grupos de pH 5 y 6.9 con un Cq promedio de 18,9 y el grupo a pH 6.9 frente a otros grupos presentó significancia estadística ($p \leq 0.05$) con Cq promedio de 14.5. Estos resultados reafirmaron que se considere el pH 6.9 como el óptimo para continuar los próximos ensayos.

5.2.4. Determinación de la concentración de micropartículas de quitosano entrecruzado para la adsorción de ADN

Se evaluó la concentración óptima de micropartículas QE al 1% con máxima capacidad de captura de ADN (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de micropartículas de quitosano QE 1% en diferentes volúmenes y la capacidad de captura de ADN

Volúmen	CONCENTRACIÓN (mg/mL)		
	1.5	3	6
	Cq (\bar{x})		
Escala 1 mL	17.7	18.7	17.7
Escala 10 mL	19.4	26.3	40

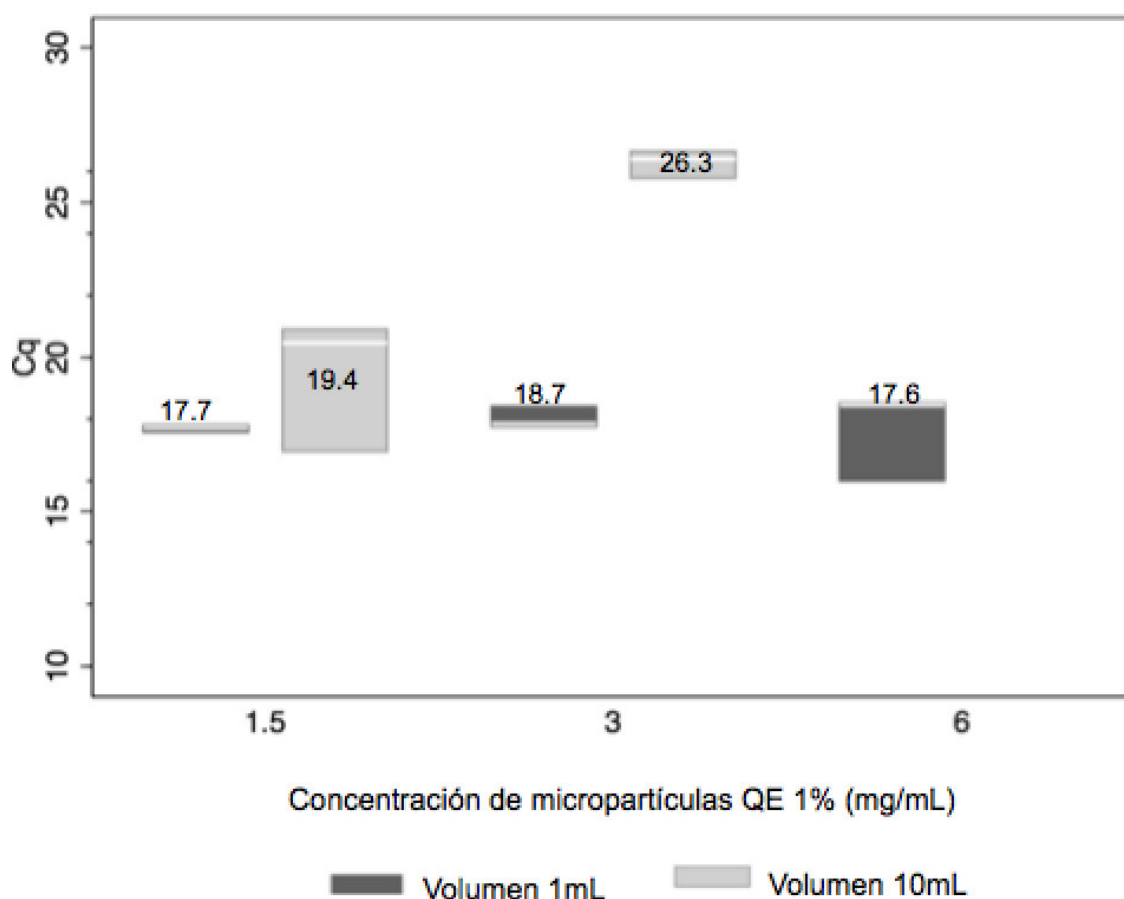


Figura 20. Efecto de la concentración de micropartículas QE 1% y la captura de ADN. Valores de Cq obtenidos por PCR en tiempo real del ADN plasmídico usando diferentes pHs. Se realizó la comparación mediante prueba de Kruskal-Wallis, en volumen 1 mL ($p= 0.4$) y en volumen 10 mL ($p=0.02$). Cq: ciclo de cuantificación.

En la Figura 20, se presentan los valores de Cq detectados en el PCR en tiempo real, en volúmenes de 1 mL y 10 mL. Los resultados entre ambos ensayos fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$).

Los ensayos realizados con volúmenes de 1mL de medio en 3 diferentes concentraciones, no se observó diferencia significativa ($p \geq 0.05$), debido a que los valores de Cq son similares (Tabla 5).

Por otro lado, los ensayos realizados con volúmenes a escala de 10 mL, se observó valores de Cq con diferencia estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las diferentes concentraciones empleadas y mostró que el menor valor de Cq se obtuvo usando 1.5 mg/mL (Cq=19.45), demostrando

así que la mayor adsorción de ADN ocurre a esa concentración en volumen de 10 mL, debido a que el objetivo finalmente es capturar y concentrar ADN desde volúmenes mayores, se seleccionó emplear 1.5 mg/mL para continuar los próximos ensayos.

Los resultados entre ensayos realizados de acuerdo a la concentración de quitosano entrecruzado al 1 % no fueron estadísticamente significativos ($p > 0.05$) también estos análisis mostraron que a 1.5 mg/mL no se presentó diferencia estadística frente a los otros grupos, sin embargo la concentración de 3mg/mL y 6 mg/mL mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

5.2.5. Determinación del tiempo óptimo entre las micropartículas de QE al 1% y el ADN

Se realizó un PCR en tiempo real de las micropartículas de QE al 1% para evaluar diferentes tiempos de contacto de las micropartículas de QE al 1% y el ADN contenido en orina.

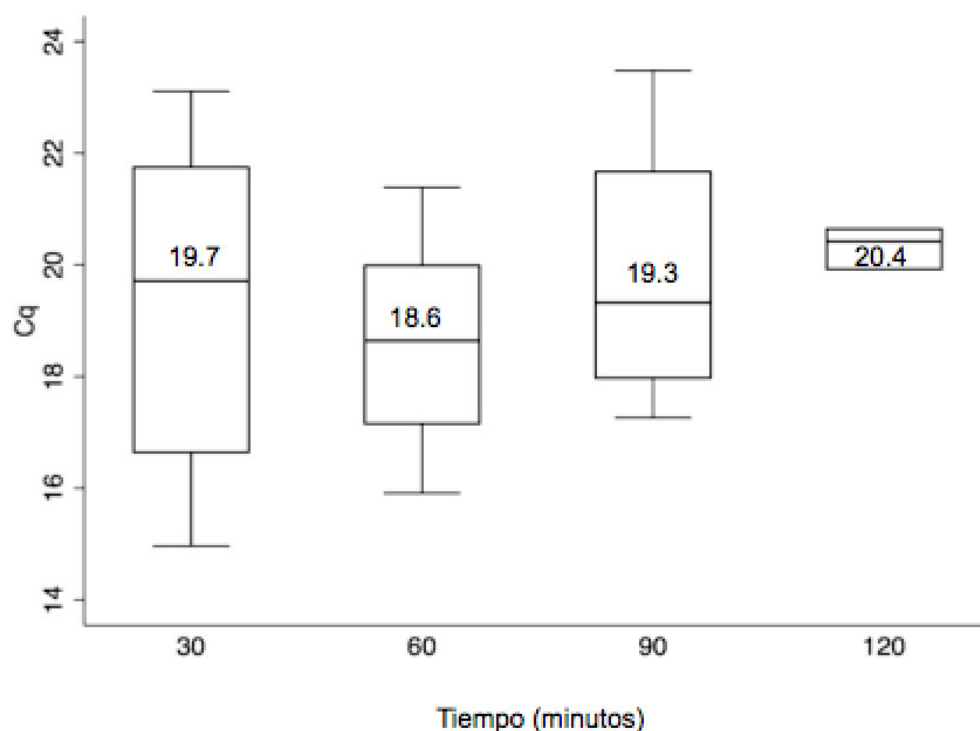


Figura 21. Efecto del tiempo entre las micropartículas de QE 1% en la captura de ADN. Valores de Cq obtenidos por PCR en tiempo real del ADN plasmídico empleando diferentes tiempos (minutos). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, $p = 0.7325$. Cq: ciclo de cuantificación.

La Figura 21, muestra los valores de amplificación de Cq usando las micropartículas de QE al 1% a diferentes tiempos de contacto, demostrando que no existe relevancia estadística sobre la adsorción de ADN en referencia con el tiempo ($p > 0.05$).

Además, se puede observar los valores de la mediana de Cq, estos se encuentran en rangos 18.64 – 20.42, estableciendo que el tiempo óptimo que permite la máxima capacidad de adsorción de ADN (Cq = 18.6) correspondió a 60 min.

5.2.6. Determinación del método de desorción del ADN

Se realizó el PCR en tiempo real empleando micropartículas de QE al 1% para evaluar diferentes métodos de desorción realizados para recuperar la máxima cantidad ADN.

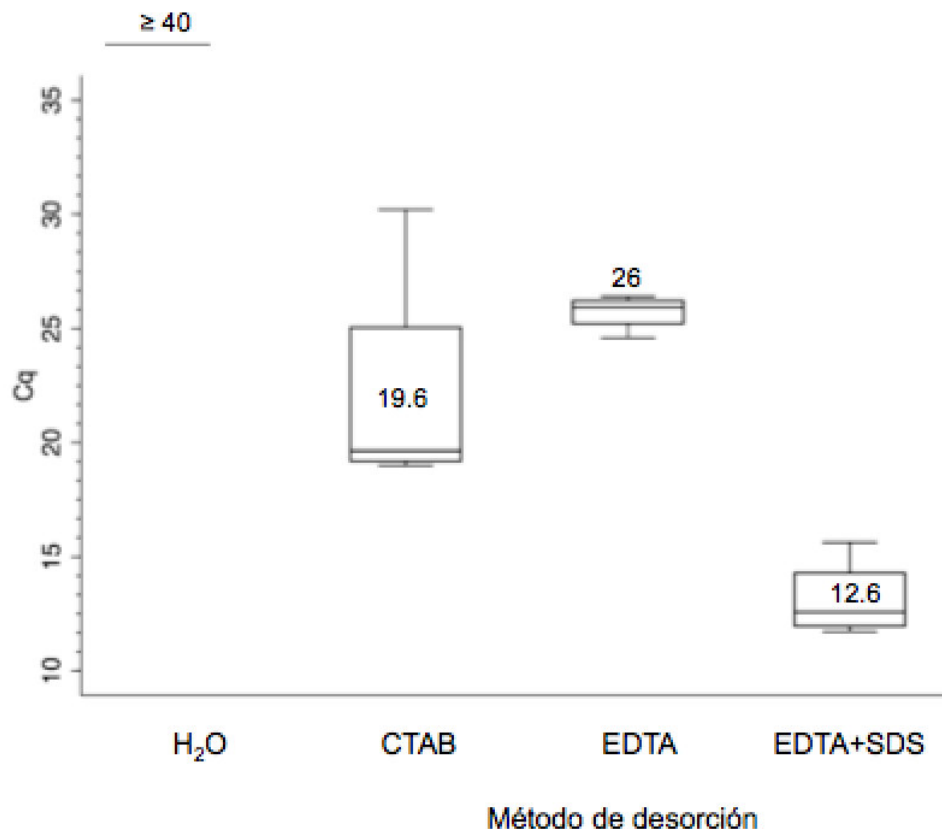


Figura 22. Medios de desorción del ADN en orina. Valores de Cq obtenidos por PCR en tiempo real del ADN plasmídico empleando diferentes métodos de desorción. Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, $p=0.0041$. Cq: ciclo de cuantificación.

H₂O: Agua ultrapura

CTAB: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

SDS: Dodecilsulfato sódico

En la Figura 22, se demuestran los valores de Cq de los resultados de los diferentes tratamientos de desorción empleados, mostrando entre ellos diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), así también, el

sobrenadante obtenido de cada tratamiento de desorción no mostraron la presencia de ADN en la amplificación por PCR en tiempo real ($C_q \geq 40$), no obstante, la cantidad de ADN obtenido como resultado de la adsorción del ADN usando las micropartículas presentó diferentes valores de amplificación por cada método de desorción aplicado, mostrando valores de mediana de C_q entre 12.57 a 40; siendo así, el tratamiento con la solución de EDTA y SDS (tratamiento “D”) presentó el menor valor de C_q (12.57), por ende, fue el método seleccionado como parte del procedimiento, así también se estableció previamente al tratamiento seleccionado “D” aplicar métodos físicos antes de la purificación del ADN con fenol-cloroformo, es decir, las micropartículas conteniendo el ADN adsorbido se expuso a altas temperaturas junto con la solución de EDTA y SDS, logrando facilitar la desorción de ADN.

5.2.7. Límite de detección de ADN usando micropartículas de quitosano

a) ADN plasmídico (IAC)

En las diferentes diluciones realizadas anteriormente con el ADN plasmídico se realizó un PCR en tiempo real para confirmar la presencia de ADN.

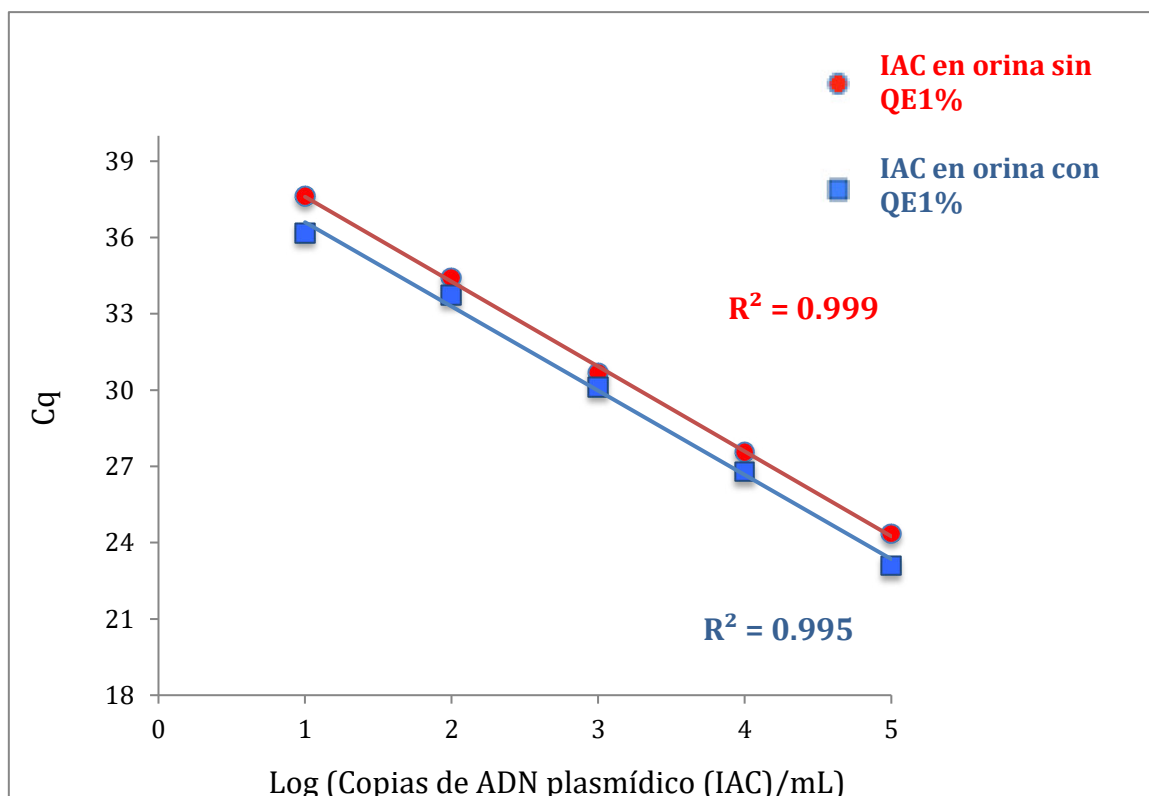


Figura 23. Comparación del límite de detección de ADN plasmídico (IAC) en orina. En el eje Y se encuentra el ciclo de cuantificación (Cq), o ciclo en que la señal de fluorescencia cruzó el umbral de detección, y en el eje X se encuentra la cantidad de ADN expresada en logaritmo de copias de ADN plasmídico (IAC) por mL. La línea en rojo representa los resultados de la amplificación lineal de las muestras de orina sin el uso de micropartículas y la línea en azul representa los resultados de la amplificación lineal de las muestras de orina usando las micropartículas QE 1%. R^2 : coeficiente de Pearson. QE1%: micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.

En la Figura 23, se observa la detección del ADN en orina infectada con ADN plasmídico, los resultados permitieron establecer la curva estándar, determinando el límite de captura del ADN fue hasta 10^1 copias de plásmido/mL empleando micropartículas de QE al 1% o sin ellas, sin embargo, los valores de Cq evidenciaron que la capacidad de adsorción se incrementó al emplear las micropartículas de QE al 1%, por lo tanto, se logró una mayor recuperación de ADN.

b) ADN de *T. cruzi*

En las diferentes diluciones realizadas anteriormente con el ADN de *T. cruzi* se realizó un PCR en tiempo real para confirmar la presencia de ADN.

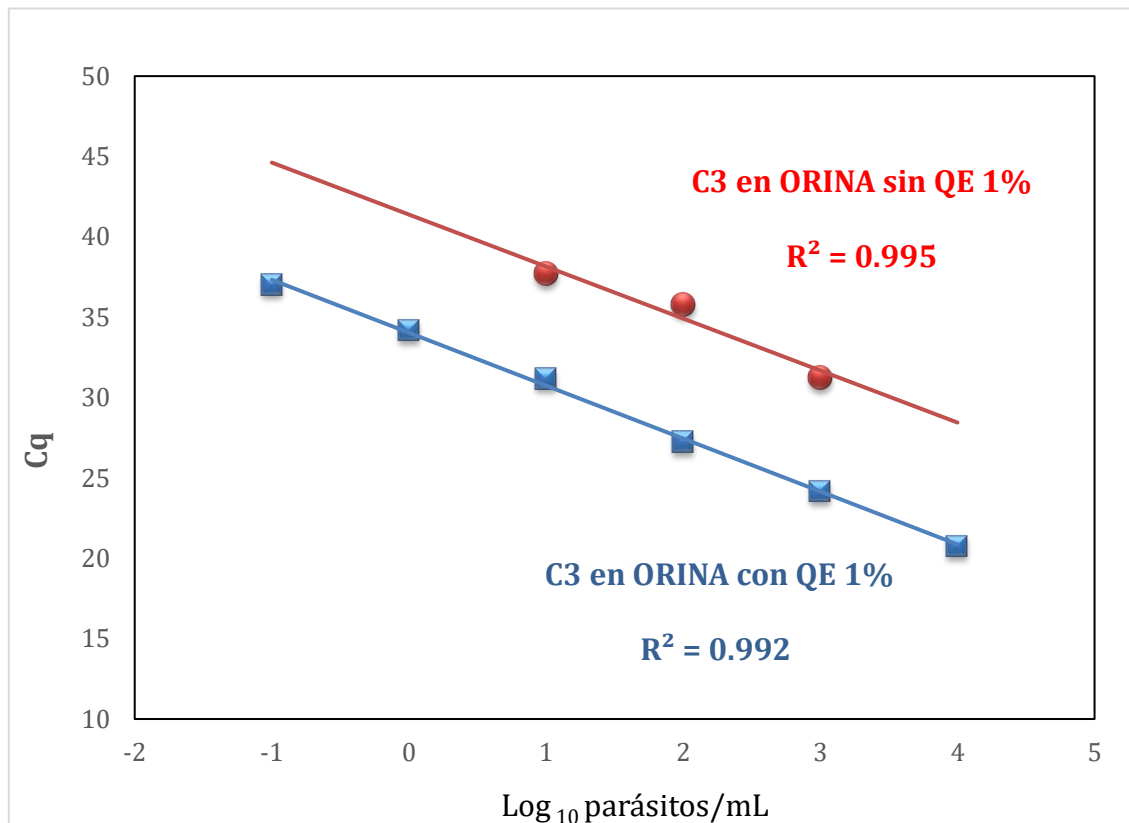


Figura 24. Comparación del límite de detección de ADN de la región satélite de *T. cruzi* (C3) en orina. En el eje Y se encuentra el ciclo de cuantificación (Cq), o ciclo en que la señal de fluorescencia cruzó el umbral de detección, y en el eje X se encuentra la cantidad de ADN expresada en logaritmo de parásitos/mL. La línea en rojo representa los resultados de la amplificación lineal de las muestras de orina sin el uso de micropartículas QE 1% y la línea en azul representa los resultados de la amplificación lineal de las muestras de orina usando las micropartículas de QE1% R^2 : coeficiente de Pearson. QE1%: Micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.

La Figura 24, muestra los resultados de la comparación de los valores de Cq del ADN de *T. cruzi* en orina usando qPCR dirigido a la región satélite del ADN del parásito. La línea azul representa la señal de fluorescencia obtenida empleando micropartículas de QE al 1% y la línea roja representa la señal de fluorescencia obtenida sin el uso de ellas, básicamente se observó que en la orina infectada con ADN de *T. cruzi* se logró detectar

hasta 10^1 parásitos/mL, sin embargo usando micropartículas de quitosano se incrementó la detección de ADN, logrando detectar hasta 0.1 parásitos/mL, estos resultados permiten demostrar que el uso de estas micropartículas de QE al 1% incrementa la capacidad de adsorción del ADN parasitario en orina.

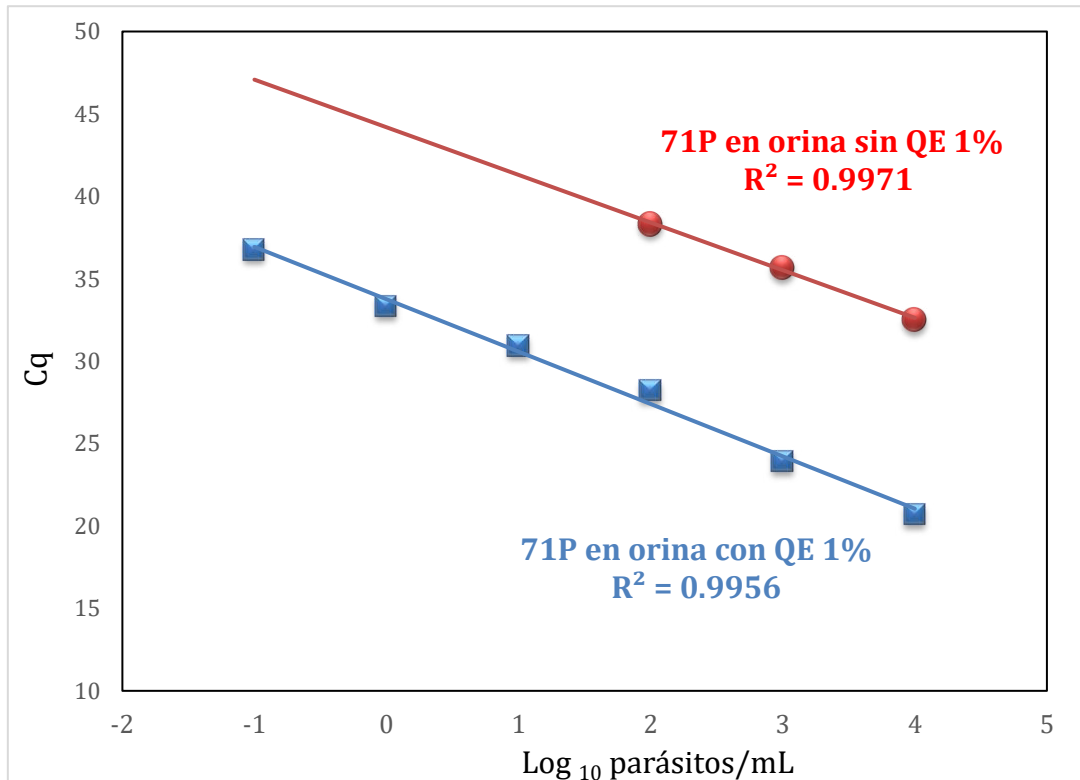


Figura 25. Comparación del límite de detección de ADN de la región del kinetoplasto de *T. cruzi* (71 P) en orina. En el eje Y se encuentra el ciclo de cuantificación (Cq), o ciclo en que la señal de fluorescencia cruzó el umbral de detección, y en el eje X se encuentra la cantidad de ADN expresada en logaritmo de parásitos/mL. La línea en rojo representa los resultados de la amplificación lineal de las muestras de orina sin el uso de micropartículas QE 1% y la línea en azul representa los resultados de la amplificación lineal de las muestras de orina usando las micropartículas de QE1%. R^2 : coeficiente de Pearson. QE1%: Micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.

La Figura 25, muestra la comparación de los valores de Cq del ADN de *T. cruzi* en orina dirigido a la región del kinetoplasto del ADN del parásito, la línea azul representa la señal de fluorescencia obtenida usando micropartículas de QE al 1%, mientras que la línea roja representa la señal obtenida sin el uso de ellas, principalmente se observó que en la orina con ADN de *T. cruzi* se logró detectar hasta 10^2 parásitos/mL, sin embargo

usando micropartículas se halló la detección hasta 0.1 parásitos/mL, estos resultados permitieron demostrar que el uso de estas micropartículas de QE al 1% incrementó la capacidad de adsorción del ADN parasitario en orina.

Por lo tanto, estos resultados permitieron demostrar que el uso de micropartículas QE al 1% incrementa la capacidad de detección del ADN satélite y kinetoplasto de *T. cruzi*, evidenciando su eficiencia en la orina que podría mejorar la sensibilidad de detección de los métodos actuales.

5.3. Evaluación *in vivo* de la sensibilidad y especificidad del uso de micropartículas QE al 1 % para el diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi* en orina

Del grupo de casos (n=28), el qPCR del ADN de la región satélite (C3) de *T. cruzi* logró detectar 7 muestras (25%) de los casos, mientras que el qPCR del ADN del kinetoplasto (71P) de *T. cruzi* logró detectar 20 muestras (71 %) de los casos (Tabla 6).

Del grupo de controles (n=13), el qPCR del ADN de la región satélite (C3) de *T. cruzi* y qPCR del ADN del kinetoplasto (71P) de *T. cruzi* no detectaron ninguna de estas muestras, considerándolas negativas (Tabla 6).

Tabla 6. Sensibilidad y especificidad del qPCR de dos regiones de ADN de *T. cruzi* empleando micropartículas de QE 1%

		qPCR			
		C3		71P	
		+	-	+	-
Infectados	27(100%)	7(25%)	21(75%)	20(71%)	8(29%)
No infectados	13(100%)	0(0%)	13(100%)	0(0%)	13(100%)

C3: Región satélite de *T. cruzi*.

71P: Región kinetoplasto de *T. cruzi*.

Por lo tanto, se logró observar la diferencia en la distribución del Cq entre las muestras infectadas y no infectadas (Figura 26).

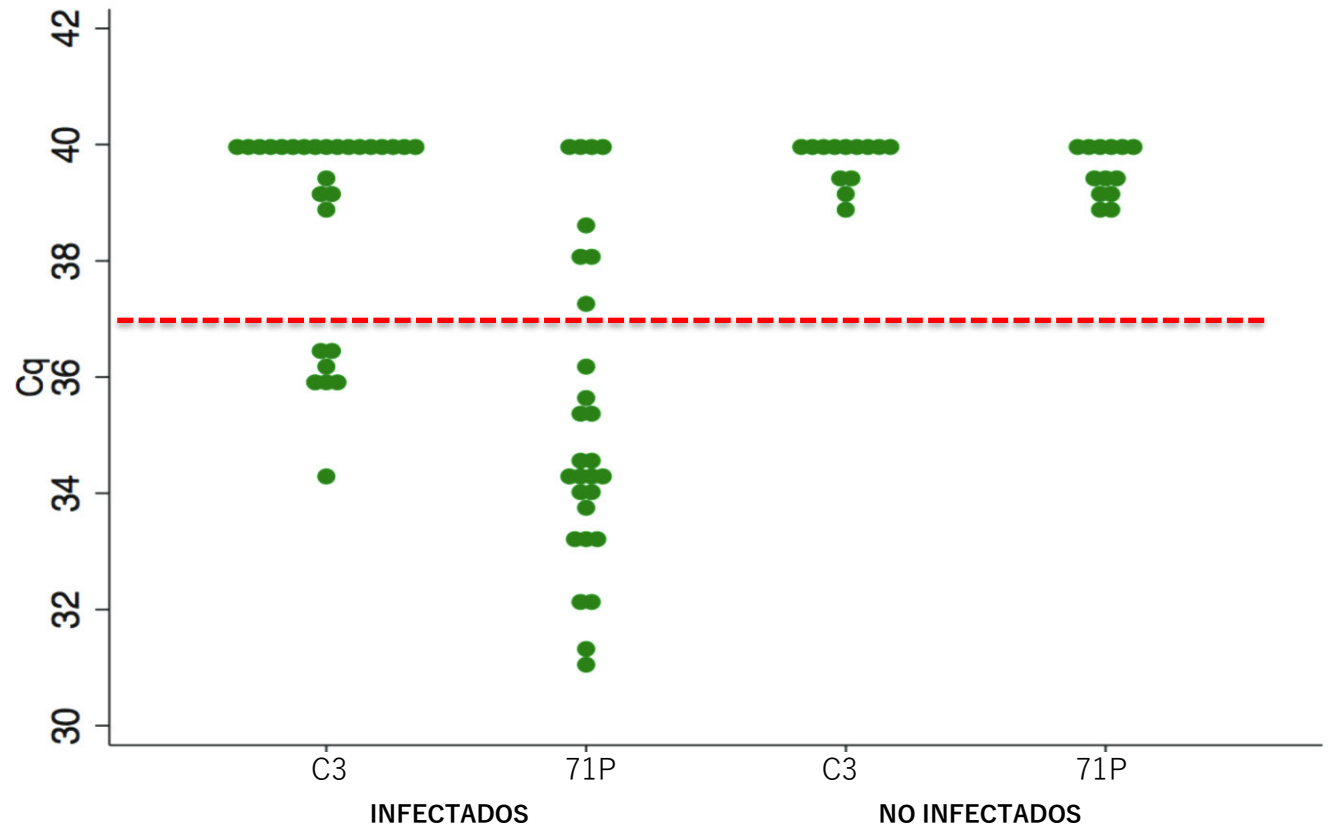


Figura 26. Distribución de los resultados del qPCR de dos (02) diferentes regiones de ADN de *T. cruzi* usando micropartículas de QE1 %. El diagrama de puntos muestra los valores de Cq obtenidos por qPCR en tiempo real usando la región del ADN satélite (ADNsat) -C3 y la región del ADN del kinetoplasto (ADNk) -71P a partir de muestras de orina de *Cavia porcellus* (cuy) infectados (n= 28) y no infectados (n=13). La línea horizontal roja representa el límite de detección del qPCR y permite distinguir los resultados como positivo o negativo.

Así también, en la Tabla 7, se presentan los resultados de sensibilidad y especificidad por qPCR por cada tipo de región del qPCR.

Los hallazgos de la sensibilidad de acuerdo al tiempo de infección (Figura 27).

Para el grupo de 14 días post-infección (14 dpi) usando qPCR para la región satélite (C3) fue de 42 % (9/14) y usando el qPCR para la región del kinetoplasto fue de 78% (11/14).

Para el grupo de 45 días post-infección (45 dpi) usando qPCR para la región satélite (C3) fue de 7 % (1/14) y usando el qPCR para la región del kinetoplasto fue de 64% (9/14).

Los resultados obtenidos de especificidad para los grupos de infección para ambas regiones del qPCR fueron del 100%.

Tabla 7. Valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN en animales infectados experimentalmente

	14 dpi		45 dpi	
	C3	71 P	C3	71 P
Sensibilidad	42	78	7	64
Especificidad	100	100	100	100
VPP	100	100	100	100
VPN	61	81	50	72

dpi: días post-infección

C3: Región satélite

71P: Región kinetoplasto

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

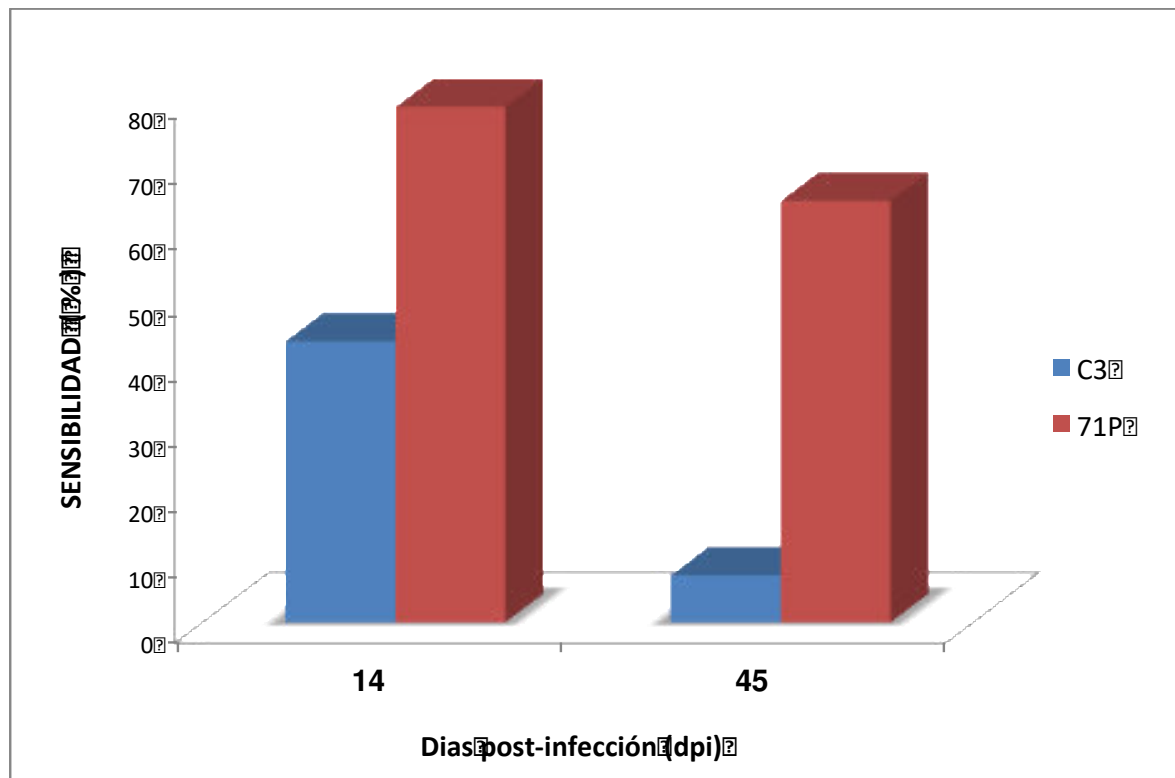


Figura 27. Sensibilidad del qPCR en diferentes periodos de infección. Las barras azules representan el valor de sensibilidad usando la región ADN satélite (ADNsat) -C3 y la barras rojas representan el valor de sensibilidad usando la región ADN del kinetoplasto (ADNk) -71P.

VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio se describe por primera vez la capacidad de adsorción y desorción de micropartículas de quitosano, logrando recuperar el ADN contenido en muestras no invasivas como la orina, estas micropartículas mostraron capacidad de concentrar el ADN a partir de volúmenes mayores a los usados por los métodos convencionales, esto brindó la posibilidad de recuperar la escasa cantidad de ADN liberado en orina y concentra el ADN contenido en la muestra, de esta forma la investigación abre las puertas a un nuevo método de diagnóstico no invasivo usando micropartículas de quitosano en las plataformas de PCR en tiempo real utilizadas actualmente a partir de muestras sanguíneas (coágulo, suero, plasma, etc.).

6.1. Síntesis y caracterización de micropartículas modificadas en base de quitosano

Hasta el momento, se han publicado numerosos artículos debido a las múltiples aplicaciones del quitosano en diferentes áreas, en cuanto a la biomedicina reportó su uso en ingeniería de tejidos, liberación de fármacos, recubrimiento antibacteriano (Tan *et al.*, 2013), sin embargo una de sus principales desventajas es su solubilidad, el quitosano es soluble en soluciones diluidas ácidas, esto representa el principal factor que ha limitado el avance de su aplicación, reduciendo así, la posibilidad del uso potencial de este biopolímero (Ruiz *et al.*, 2002).

El quitosano está compuesto por las unidades repetitivas de glucosamina enlazadas con grupos hidroxilo y amino, este último representado por altas cantidades de nitrógeno, ambos grupos químicos funcionales son los que ofrecen la posibilidad de la modificación en su superficie para adaptarse potencialmente a aplicaciones específicas (Hoven *et al.*, 2007).

En este estudio también se realizó modificaciones químicas para la obtención de diferentes tipos de micropartículas de quitosano, logrando conservar sus propiedades químicas y al mismo tiempo mejorar sus

propiedades, especialmente la solubilidad en medios fisiológicos, también sus propiedades biológicas pudiendo así ampliar sus aplicaciones, estas modificaciones fueron a través de la agregación de grupos funcionales y/o reacciones de reticulación (unión de cadenas macromoleculares entre sí), teniendo diferentes tipos de micropartículas de quitosano para evaluar su capacidad de adsorción del ADN. La formación de los derivados del quitosano conduce al aumento de sus propiedades, en especial el incremento de la capacidad de adsorción y resistencia a condiciones extremas, esto permite la aparición de nuevos materiales modificados con gran potencial de aplicación en el futuro (Rajasree & Rahat, 2013; Kyzas & Bikiaris, 2015).

En la caracterización mediante espectroscopia infrarroja (IR) se mostraron los diferentes perfiles de las micropartículas modificadas de quitosano en comparación a la del quitosano matriz, confirmando la modificación producida en concordancia a estudios anteriores reportados (Yao *et al.*, 2012).

Las micropartículas de quitosano cuaternizado (QC) obtenidas por la adición de grupos funcionales, se dio por el ataque nucleofílico del grupo amino ($-NH_2$) al adicionar cloruro de glicidiltrimetilamonio como agente cuaternizante (Cconislla *et al.*, 2016) donde se produce la ruptura del epóxido que forma parte del reactivo (Díaz, 2012). Los espectros presentados en el FTIR del QC mostraron un pico intenso aproximadamente entre la región 1471 cm^{-1} a 1485 cm^{-1} que corresponde a la tensión de los hidrógenos por la formación de grupos metilo del amino cuaternario, también se observó un pico pronunciado en la región 3300 cm^{-1} , que corresponde a los grupos amino y a la tensión de OH debido al número adicional de grupos hidroxilos como resultado de la apertura del cloruro de glicidiltrimetilamonio, los resultados son consistentes con los hallados en otras investigaciones (Zhang *et al.*, 2011, Cconislla *et al.*, 2016).

Así también, el pico en la región 3300 cm^{-1} se aprecia que la intensidad se reduce inversamente proporcional a la cantidad de GTAG, ello ocurre

debido a que a medida que se adiciona GTAG se pierden más grupos amino para que se produzca la cuaternización.

Se evidenció, que las micropartículas de QC resultantes fueron fácilmente solubles al contacto con el medio de resuspensión y el ADN contenido, sin embargo, esta propiedad impidió la separación de las micropartículas con el medio de resuspensión inicial.

En cuanto al quitosano entrecruzado (QE), los perfiles FTIR mostraron la reducción de picos en rangos de alrededor de 1363 cm^{-1} que corresponden a los grupos $-\text{CH}$ y 1155 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones propias de su estructura (Cconislla *et al.*, 2016, Jahuira-Arias *et al.*, 2016) esto como producto de la reticulación, además de la aparición de un pico aproximadamente en la región 1650 cm^{-1} como producto de la interacción del glutaraldehído con el quitosano, algunos autores reportan este pico en la región 1610 cm^{-1} (Ramachandran *et al.*, 2011) , 1635 cm^{-1} (Oryton *et al.*, 1999) y entre 1660 cm^{-1} a 1664 cm^{-1} (Knaul *et al.*, 1999).

En el caso de las micropartículas de QE no se apreció la solubilidad con el medio, sin embargo, se logró la interacción con el ADN mediante la resuspensión con el medio.

En referencia al quitosano cuaternario entrecruzado (QCE), mostró las bandas similares a las observadas en el QC y QE y respecto a su solubilidad, se logró observar una solubilidad menor en comparación con las micropartículas QC.

Es preciso indicar que, los resultados de caracterización de las micropartículas desarrolladas en esta investigación mediante FTIR y mediante otras técnicas han sido publicadas, evidenciando que dichas modificaciones permitieron mejorar las propiedades de adsorción (Cconislla *et al.*, 2016; Jahuira- Arias *et al.*, 2016).

6.2. Evaluación *in vitro* de la adsorción- desorción del ADN usando micropartículas en base a quitosano

Después de sintetizar y caracterizar las diferentes micropartículas de quitosano, el siguiente objetivo fue demostrar si alguna de ellas podría capturar el ADN y así aislarlo. Por esta razón, fue necesario demostrar “*in vitro*” esta capacidad mediante la detección de una región del ADN humano usando como blanco la región “RNase P Humano” a través de PCR en tiempo real, la cual es usada generalmente como control interno de rutina en técnicas de PCR.

En un primer instante el ADN humano fue infectado en muestras de orina, sin embargo la orina al ser un fluido biológico, muchas veces presenta ADN propiamente humano (Botezatu *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2004a; Su *et al.*, 2004b; Illanes *et al.*, 2006; Umansky & Tomei, 2006; Salvi *et al.*, 2016) y al usar como blanco de amplificación “RNase P Humano”, los resultados de detección no permitieron determinar con precisión si la cantidad de ADN era únicamente el infectado o el excretado de forma natural en la orina, el cual es variable dependiendo de las condiciones fisiológicas y/o patológicas de cada individuo. Para obtener resultados seguros y más precisos, se determinó que la mejor opción para identificar de forma precisa el ADN fue usar una secuencia de ADN totalmente ajena al ADN humano, en virtud a ello, se usó como blanco la secuencia del gen de *Arabidopsis thaliana* insertada en un plásmido, la utilidad de este tipo de plásmido ha sido reflejada como control interno de amplificación (IAC) de rutina en técnicas de PCR (Duffy *et al.*, 2009; Duffy *et al.*, 2013), por otro lado la infección del ADN se realizó en medios artificiales estériles para evitar así el riesgo de resultados erróneos del qPCR ya sea contaminantes externos, inhibidores de PCR entre otros.

Los primeros resultados de evaluación entre la interacción de ADN y quitosano mediante PCR, demostraron que las micropartículas obtenidas por reticulación con glutaraldehído, denominadas micropartículas entrecruzadas “QE”, son las que reflejaron la capacidad de capturar el ADN

plasmídico, esto se ha visto reflejado por los valores de Cq ("Threshold point" o ciclo umbral) del PCR, evidenciando así la capacidad de adsorción del ADN, esto ha sido concordante con otros estudios (Ozbas *et al.*, 2003; Akbuğa *et al.*, 2004).

Por el contrario, otros estudios han revelado que policomplejos de quitosano cuaternario (QC) evidenciaron el incremento de su capacidad de interacción con iones de cargas negativas y su capacidad antibacteriana (Sajomsang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013), los resultados de este estudio en referencia a las micropartículas cuaternarias (QC) no se asemejan a ello, por lo cual no se obtuvo resultados favorables de interacción, uno de los mayores problemas que se presentó fue la baja solubilidad en el medio.

Respecto a los resultados con las micropartículas cuaternizadas entrecruzadas (QCE), no se logró evidenciar presencia de ADN, por lo que se puede asumir de baja reactividad. Ahora bien, otras investigaciones si han logrado obtener resultados favorables, como la capacidad de adsorber sustancias y/o metales aniónicos, cuya capacidad ha sido asumida por las características del quitosano cuaternario y el entrecruzamiento con glutaraldehído, reforzando sus mecanismos de interacción, resistencia mecánica y química frente a otros biopolímeros (Díaz, 2012; Iparraguirre *et al.*, 2010); sus propiedades como adsorbente son también reportadas en la formación de una resina que permitió adsorber aniones nitrato y fosfato (Sowmya *et al.*, 2014), además se ha reportado que las micropartículas QCE mostraron una superficie más compacta respecto a micropartículas QC.

Al obtener resultados significativos con las micropartículas QE, se determinó continuar en los siguientes ensayos únicamente con este tipo de micropartículas variando la concentración del agente entrecruzante para profundizar la investigación.

Al igual que los resultados de este estudio, la capacidad de adsorción empleando micropartículas de QE han sido reportada también por Gonçalves *et al.*, (2005), donde destacó que el entrecruzamiento covalente es una de las modificaciones que influye en mejorar las propiedades del quitosano, en el área biomédica también se ha mencionado la importancia del incremento de sus propiedades (Sánchez *et al.*, 2007). La modificación del quitosano con glutaraldehído y su capacidad de adsorción ha tenido también éxito con otros aniones como Arseniato (As III) y Arsenito (V) donde la interacción electrostática y los enlaces hidrógeno son los principales mecanismos involucrados.

Es preciso mencionar, que la utilidad de las micropartículas QE a diferentes cantidades con glutaraldehído reafirmaron su capacidad de captura de ADN, considerando que el agente entrecruzante involucra la unión covalente de las unidades del quitosano formando redes porosas entre sí (Berger *et al.*, 2004a), sin embargo, también en el sobrenadante se encontró también la presencia de ADN, por lo cual se analizó a mayor profundidad, si la influencia de la cantidad de glutaraldehído en la formulación de las micropartículas influye en la adsorción.

Los resultados mostraron que pese a que no había diferencia estadística en la capacidad de captura del ADN entre los tres tipos de micropartículas de glutaraldehído; las micropartículas QE al 1% con glutaraldehído no mostraron evidencia de ADN liberado en sobrenadante y la cantidad detectada de ADN fue mayor en comparación de los otros dos grupos, en ese sentido, se sugiere que a menor cantidad de agente entrecruzante permite una mayor captura de ADN.

Resultados previos de esta investigación lograron evidenciar mediante pruebas de adsorción que QE 1% adsorben en mayor cantidad el ADN en comparación al QE 5%. El proceso de esta adsorción se aproximó al modelo de isoterma de Freundlich (Cconislla *et al.*, 2016).

Asimismo, la capacidad de adsorción de las micropartículas de QE con glutaraldehído se ha reflejado también en la investigación de Mahaninia & Wilson (2017), donde se logró determinar mediante estudios cinéticos que la capacidad de adsorción de aniones fosfatos decrecen cuando se incrementa la cantidad de entrecruzante, por lo que se puede inferir que uno de los mecanismos de adsorción fue principalmente por difusión interpartículas, el mismo, que es influenciado por la cantidad del agente entrecruzante usado en la modificación del quitosano (Mahaninia & Wilson, 2017), ello permite, sugerir que los grupos aminos que no intervienen en el entrecruzamiento son los que permiten la interacción con el ADN, por ello, la relación es inversamente proporcional entre la cantidad de agente entrecruzante y ADN detectado.

6.2.1. Factores para la formación de complejos quitosano – ADN

Los ácidos nucleicos como el ADN y el ARN, son componentes biológicamente activos de una cadena principal y con carga negativa (Nash *et al.*, 2017), la formación de los complejos entre el quitosano y ADN es el resultado de la interacción electrostática entre los grupos fosfato del ADN (carga negativa) y los grupos aminos (carga positiva) del quitosano (Jansson, 2010).

Se ha observado que el pH es uno de los factores más influyentes en la adsorción y desorción de moléculas biológicas, drogas o aniones (Sato & Yoshio, 2001; Zhao *et al.*, 2006), otro aspecto importante de mencionar es el valor de pKa de ~ 6.4 del quitosano, esto permite indicar, que a pH menores de este valor los grupos aminos del quitosano se protonan y logran una mayor unión con grupo fosfato del ADN (Mao *et al.*, 2010; Alameh *et al.*, 2012; Bravo-Anaya *et al.*, 2016), no obstante, los resultados indican que la mayor capacidad de adsorción del ADN tanto en medios artificiales y orina ocurre a un pH de 6.9, el cual es mayor al pKa del quitosano, estos resultados tienen relación a lo revelado por Fukusihima en el 2005, que afirma que la porosidad de los complejos quitosano - ADN

se reducen a pH cercano a 7, otorgándole mayor estabilidad de unión del complejo (Fukushima *et al.*, 2005, Jahuira - Arias *et al.*, 2016).

A pesar de ello, los mecanismos de unión entre micropartículas de QE y ADN no están totalmente elucidados, no obstante, la investigación en ello continua y ha sido Pandit *et al.*, (2015) quien trato de dilucidar por primera vez estos mecanismos, explicando lo que sucede entre micropartículas entrecruzadas de quitosano a pH por encima de su propio pKa, en este sentido, se postula que hay grupos aminos que parecen estar ionizados incluso a pH por encima del pKa del quitosano, por otro lado, el ADN podría ingresar a través de las estructuras nanoporosas de este tipo de micropartículas e internándose en un microambiente de las micropartículas; precisamente Jansson (2010), afirma este posible mecanismo de adsorción del ADN desde la superficie de nanopartículas de quitosano a través de interacciones secundarias no electrostáticas como enlaces de hidrógeno (Jansson, 2010).

Es preciso mencionar que recientes investigaciones evaluaron la influencia del pH en rangos de pKa del quitosano, demostrando por técnicas espectrométricas de imagen que el pH influye en los cambios morfológicos del complejo quitosano - ADN, (Wang *et al.*, 2015; Agudelo *et al.*, 2016), sin afectar la interacción del complejo.

Recientemente, Bravo-Anaya ha revelado nuevas evidencias de los mecanismos de formación del complejo ADN-quitosano, donde se confirma que la unión es por mecanismos electrostáticos y son varios factores involucrados (MW,DA,pH) sin embargo, se mencionan tres factores importantes en cuanto a la estabilidad de este complejo: pH, relación de cargas del quitosano y ADN (N+/P) y concentración de sales (Bravo-Anaya *et al.*, 2019).

Los resultados del estudio, reafirman la capacidad de unión entre el quitosano y ADN a pH cercanos a 7, demostrando que se encuentran aún grupos aminos protonados y que la relación de cargas entre ambos (N+/P)

es óptima y permite la formación y estabilidad del complejo por factores electrostáticos. También se puede sugerir que el ADN ingresa por difusión a la red formada por entrecruzamiento donde a mayor pH la porosidad de este entrecruzamiento es menor, haciendo más estable esta unión.

Además, se ha determinado la cantidad de micropartículas de QE al 1% como parámetro de evaluación en la adsorción de ADN, pese a que no hay muchos estudios que reportan la importancia de este parámetro, algunos indican que la cantidad de micropartículas y/o nanopartículas de quitosano influye directamente con la capacidad de adsorción (Shi Lu-E & Tang ZX, 2009), sin embargo la cantidad que mostró mejores resultados en los ensayos en volumen de 1 mL fue de 6 mg/mL y en volumen igual a 10 mL fue de 1.5 mg/mL, estos resultados sugieren que a mayor volumen de muestra se requiere una menor cantidad de micropartículas, sin embargo un punto importante es el método de desorción el cual es evaluado posteriormente, es posible que a mayor cantidad de micropartículas en volúmenes mayores también exista unión con otros aniones propios de la orina (cloruros, sulfatos, fosfatos), resultando complejos de quitosano-ADN más complejos, estas uniones resultan ser igual de complejas en la desunión, por lo tanto no se llega a liberar el 100% de ellos, lo cual es reflejado con la baja cantidad de ADN detectado.

Acerca del tiempo de contacto necesario para la formación de estos complejos entre el quitosano y ADN, los resultados mostraron eficiencia de adsorción a partir de los 30 min (tiempo mínimo en el ensayo), otros investigadores han reportado que el tiempo de contacto es relativamente corto desde la interacción en algunos seg. hasta 10 min, logrando una gran capacidad de captura de ADN (Pandit *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2016) no obstante, también se observó que a partir de 20 min se determina la máxima capacidad de adsorción, permaneciendo constante (Tiwari *et al.*, 2016). La variable tiempo en el estudio no representó un factor significativo en la adsorción de ADN ($p > 0.05$), por esta razón, si el tiempo de contacto se incrementa la capacidad de captura de ADN no se incrementará debido a que como se ha mencionado el tiempo de formación del complejo

quitosano y ADN es relativamente corto y logra capturar todo el ADN en el mínimo tiempo, así también, se estableció que 1 hora sea el tiempo de contacto, esto debido a que se presentó el menor valor de Cq (18.64).

Si bien las micropartículas de QE al 1% demostraron eficiente capacidad de adsorción de ADN por diferentes mecanismos, ello ha dificultado la desorción del ADN, algunos han planteado la propiedad de pH dependiente, es decir, a mayor pH existe una desorción mayor de ADN (Tiwari *et al.*, 2015), sin embargo los ensayos realizados no han llegado a esa conclusión, por ello el factor de la temperatura fue incluido como factor de ruptura de unión, sin embargo si solo se adiciona la temperatura como único factor no se observó efecto alguno (Pandit *et al.*, 2015), por esta razón, adicionalmente al factor de temperatura a 95° C se adicionó un tampón específico (EDTA y SDS), el cual permitió esta desunión del complejo quitosano y ADN, por lo que podemos mencionar que el ADN se mantuvo estable bajo estas condiciones, esto ha sido corroborado por Karni *et al.*, (2013) quien reportó que la degradación del ADN se presenta a temperaturas mayores de los 120 °C (Karni *et al.*, 2013).

Además, se ha reportado la posibilidad de que las micropartículas entrecruzadas con glutaraldehído al 1% permitan el ingreso de pequeñas cadena de ADN en su interior como mecanismo de interacción, protegiendo de esta forma el ADN (Pandit *et al.*, 2015) al momento de la exposición a temperatura, en cuanto a los tampones de desunión el EDTA con SDS al 10% presento mejores resultados. Por un lado el EDTA es conocido como un agente quelante de complejos y/o cationes divalentes, su interacción con el Mg²⁺ en la reacción de PCR es conocida, más aún se encuentra en los buffer de elución de ADN, inhibe la actividad de nucleasas (Khosravinia & Ramesha, 2007) y durante el proceso de extracción el EDTA permite que el ADN quede protegido y libre de ARN y DNAsas (El-Ashram *et al.*, 2016). De otro lado, el SDS es un detergente surfactante aniónico y se ha reflejado que la estabilidad del complejo quitosano-ADN es afectada en presencia de SDS, una pequeña fracción del ADN se disocia (Bravo-Anaya *et al.*, 2019).

Por lo tanto, se podría postular que la temperatura es uno de los factores principales de desorción del ADN y el SDS desestabiliza el complejo al afectar la relación de cargas (N^+/P^-), de esta forma, el ADN queda libre y expuesto, el mismo, sería fácil de degradar, sin embargo el ADN es protegido por el EDTA, permitiendo cuantificar el ADN capturado en la plataforma de qPCR.

Al identificar el protocolo de unión y desunión de las micropartículas de quitosano con el ADN en las condiciones óptimas, se determinó el límite de detección comparando los valores de amplificación del qPCR directo desde el ADN obtenido directamente de muestras de orina infectada con ADN plasmídico mediante técnicas convencionales *versus* el ADN obtenido de muestras de orina infectadas con ADN plasmídico usando las micropartículas de QE con glutaraldehído al 1%.

Los resultados en cuanto al qPCR del ADN plasmídico (IAC), muestran que el límite de detección fue 10^1 copias/mL para ambos, el ADN plasmídico (IAC) ha sido usado ampliamente como control interno (Duffy *et al.*, 2009; Duffy *et al.*, 2013, Ramirez *et al.*, 2015). Con estos resultados se puede afirmar que las micropartículas de QE con glutaraldehído al 1% permiten recuperar la totalidad de ADN del medio.

En referencia al ADN de *T. cruzi*, su genoma es superior al de otros parásitos ($100-200 \times 10^6$ pb) y por sus cualidades de longitud y estabilidad de sus secuencias, diversas regiones nucleares y del kinetoplasto han sido utilizadas como blanco de amplificación. El ADN nuclear (satélite) y kinetoplastídico de *T. cruzi* (kADN) contiene varias secuencias repetitivas, ambas regiones han sido de utilidad en diferentes estudios (Piron *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009; Qvarnstrom *et al.*, 2012), permitiendo cuantificar la carga parasitaria.

Algunas investigaciones indican que las secuencias diana dirigidas hacia el ADN satélite presentan un mejor rendimiento para el diagnóstico de

infección congénita de Chagas (Virreira *et al.*, 2003), sin embargo, debido a que el Tr-DNA detectable son secuencias cortas, se evaluó el qPCR usando las secuencias diana tanto del ADN satélite y kADN *T. cruzi*, ambas de diferente longitud.

En cuanto al qPCR dirigido a la región satélite del parásito (C3), se evidenció la utilidad de las micropartículas de quitosano, el qPCR en orina puede detectar hasta 10 parásitos/mL y el qPCR usando las micropartículas de quitosano alcanza a detectar hasta 0.1 parásitos/mL, algo similar sucede en el qPCR del kinetoplasto del parásito, se logró detectar en orina por métodos convencionales hasta 100 parásitos/mL, sin embargo usando las micropartículas de quitosano se logró detectar 0.1 parásitos/mL. Ambos resultados evidenciaron la capacidad de adsorción y en consecuencia concentración del ADN usando las micropartículas de QE, es conocida la utilidad de la orina como un valioso fluido biológico con posibilidad de aislar ADN, sin embargo, su aplicación en el diagnóstico es aún limitada por la baja cantidad de material genético en ella, sin embargo este problema puede solucionarse si se logra obtener un método que permita concentrar ADN de grandes volúmenes de orina, esta solución podría ocurrir usando las micropartículas de quitosano.

Adicionalmente, otra limitante del uso de la orina es debido a que los componentes propios de la orina, especialmente la urea a concentraciones ≥ 50 mM actúan como inhibidores del PCR, usualmente en adultos la concentración de urea es de 330 mM, por ello, el uso de la orina como fuente de ADN es restringido (Rauter *et al.*, 2005), pero como anteriormente se ha mencionado, el aislamiento de ADN en orina usando las micropartículas de QE al tener la capacidad de adsorción al ADN, evitaría el contacto directo con la urea y otros componentes en el proceso de extracción, es más el ADN liberado que es adsorbido por las micropartículas es conservado por los tampones que evitan la degradación del mismo, haciendo posible su amplificación por qPCR.

Cada día el interés por el uso del quitosano y su capacidad de adsorción de ADN se está evidenciado en diferentes publicaciones, uno de sus mayores campos de aplicación de importancia es la liberación dirigida de fármacos, sin embargo la aplicación de micropartículas de quitosano como método de aislamiento y detección de ADN en el campo del diagnóstico es aún reciente, por ello, los recientes estudios están cada día en aumento demostrando así una nueva futura aplicación, sin embargo los resultados que evidencian esta utilidad han sido logrados con la infección de ADN ya sea en medios artificiales (Pandit *et al.*, 2015) o en fluidos con abundancia de material genético como la saliva que contiene células epiteliales (Tiwari *et al.*, 2015) o muestras sanguíneas (Nanayakkra *et al.*, 2017), los resultados de este estudio han confirmado ello y adicionalmente hemos evidenciado la capacidad de concentración de ADN.

6.3. Evaluación *in vivo* de la sensibilidad y especificidad del uso de micropartículas de quitosano modificadas para el diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi*

Finalmente con los resultados previos de la estandarización del método y las ventajas de usar las micropartículas QE 1%, el aspecto más importante de este estudio era evaluar su aplicación *in vivo*. Con el fin de conocer ello, se realizó la aplicación de estas micropartículas de QE modificadas en muestras no invasivas, como la orina, la presencia de ADN en orina y su utilidad como biomarcador de diferentes patógenos ha sido evidenciado anteriormente (Umansky & Tomei, 2006; Weerakoon y McManus, 2016). Sin embargo, en el proceso de la investigación no fue posible encontrar muestras de orina positivas a Chagas, recordemos que para que un paciente sea considerado como positivo se requiere de al menos dos pruebas diferentes que confirmen ello (WHO, 2010), además se requería volúmenes mayores a los 5 mL para evaluar tanto la capacidad de adsorción y concentración de las micropartículas de QE 1%. Para continuar con esta investigación se determinó su aplicación en muestras de orina de animales infectados experimentalmente de un estudio anterior (), las cuales

son positivas a pruebas de parasitemia por microscopia directa y PCR, ambas pruebas a partir de sangre y/o coágulo.

Grupos de investigación han reportado con éxito los modelos de infección experimental en diferentes animales, los cuales han evidenciado la presencia de ADN en orina mediante el uso de técnicas de concentración previo a la extracción de ADN por métodos convencionales (Castro-Sesquen *et al.*, 2011; Castro – Sesquen *et al.*, 2013; Yauri *et al.*, 2016). Con esta evidencia, se continuó el estudio con muestras de orina provenientes de animales infectados y no infectados, todos ellos contaban con los resultados de laboratorio y fueron clasificados como casos y controles, además tenían como mínimo volumen de orina entre 8 y 10 mL a pH 6 – 6.9.

Los resultados demostraron que la metodología aplicada tienen valores de sensibilidad entre 25 % a 71 % , esto varía de acuerdo a la secuencia diana y/o región del qPCR, la especificidad para ambas secuencias fue del 100%.

Estos resultados confirman que la utilidad de este innovador método, pese que se ha reportado en modelos animales que la detección de ADN en orina siempre ha sido menor en comparación a las muestras de sangre; se han evaluado diferentes métodos y/o técnicas costosas como la ultrafiltración, la cual permitió concentrar la orina hasta 80 veces y detectar la presencia de ADN del parásito *T. cruzi* entre 20% a 45 % (Castro – Sesquen *et al.*, 2013; Yauri *et al.*, 2016), los resultados de este estudio mostraron valores mayores a los reportados.

Es más, los resultados del análisis adicional de acuerdo al tiempo de infección se observó que los valores de sensibilidad son mayores a los 14 días post infección (dpi) en comparación a los 45 días post infección. Estos resultados están relacionados de acuerdo a lo reportado en las curvas de parasitemia, donde se ha reportado que el pico más alto de parasitemia es entre 15 – 20 dpi (Castro-Sesquen *et al.*, 2011; Yauri *et al.*, 2016), ello

explica los valores de mayor sensibilidad tanto en el qPCR dirigido a la región satélite y kinetoplasto del ADN del parásito, sin embargo, pese a que los 45 dpi la parasitemia es mucho menor, aún se evidencio diferencia en los valores de sensibilidad de acuerdo a la región dirigida del qPCR, por un lado nos muestra que la sensibilidad de la prueba usando las secuencias dirigidas a la región satélite alcanza escasamente de 7%, sin embargo, la sensibilidad se incrementó a 64% usando secuencias dirigidos a la región del kinetoplasto, estos resultados hallados pueden explicarse debido a la diferencia del tamaño del fragmento de cada región del qPCR, la región del ADN satélite presenta un tamaño de 166 pb y la región del kinetoplasto presenta un tamaño de 118 pb, se había sugerido anteriormente que una de los factores que limitan el uso de la orina como método de diagnóstico molecular es el tamaño del amplicón usado en el PCR (Umansky & Tomei, 2006; Melkonyan *et al.*, 2008), el ADN que se encuentra en orina tiene que pasar la barrera renal por lo tanto, se sugiere que los fragmentos más pequeños son más detectables en orina.

Ambas secuencias han sido ampliamente aplicados en qPCR para la detección de ADN de *T.cruzi* (Duffy *et al.*, 2000; Schijman *et al.*, 2011; Qvarnstrom *et al.*, 2012, Duffy *et al.*, 2013) también se ha reportado que el ADN del kinetoplasto representa entre un 20-30% del ADN total del parásito, en ensayos que el PCR es dirigido al kinetoplasto del ADN presenta múltiples copias del genoma del parásito, esto aumenta la sensibilidad de detección (Gonzalez *et al.*, 1984; Schijman *et al.*, 2011; Qvarnstrom *et al.*, 2012).

Considerando, que el diagnóstico actual de la enfermedad de Chagas congénito presenta restricciones biológicas y operativas, los recién nacidos de madres positivas a Chagas son asintomáticos o tienen signos inespecíficos, se realiza la detección parasitológica directa, sin embargo, ello solo detecta menos del 50% de las infecciones y logra detectar ~40–50 parásitos/mL, posteriormente en los próximos meses se realiza el seguimiento con métodos serológicos, pero la no participación supera el 80% en regiones endémicas, por ello, las técnicas moleculares han surgido

como una prueba prometedora y altamente sensible, no obstante, se requieren múltiples muestras para maximizar la sensibilidad, ocasionando la poca participación (Messenger & Bern, 2018).

El uso de las micropartículas QE 1% al concentrar el ADN contenido en la orina de los animales ha permitido cuantificar hasta 0.1 parásitos/mL, por ende, su aplicación en muestras de orina en el caso de Chagas congénito sería sumamente útil, siendo un método altamente sensible, de este modo se iniciaría el tratamiento oportuno y eficaz, evitando así, la propagación de la enfermedad.

Este innovador método también tiene potencial para futuros estudios como el monitoreo del tratamiento.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1. Se reporta por primera vez el desarrollo de micropartículas modificadas de quitosano para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas en muestras de orina, logrando la síntesis y caracterización de 15 diferentes micropartículas con diferentes modificaciones basadas en quitosano.
- 7.2. El análisis *in vitro* de la adsorción-desorción del ADN usando micropartículas modificadas en base a quitosano determinó que las micropartículas entrecruzadas con glutaraldehído al 1% lograron la mayor capacidad de capturar y concentrar ADN plasmídico y ADN de *Trypanosoma cruzi*, empleando las condiciones óptimas de: 6.9 de pH, concentración de 3mg/mL, tiempo de contacto 60 min, método de desorción mediante EDTA y SDS.
- 7.3. Se incrementó de forma eficaz la detección del ADN de origen plasmídico usando micropartículas QE con glutaraldehído al 1%, lográndose detectar hasta 10^1 copias/mL de ADN plasmídico (IAC) y 0.1 parásitos/mL de ADN de *T. cruzi* en orina.
- 7.4. Los resultados *in vivo* empleando micropartículas entrecruzadas con glutaraldehído al 1% mostraron la relación entre los valores de sensibilidad y los días post infección (dpi); en el grupo de 14 dpi usando la secuencia de la región satélite (C3) presentó el 42% de sensibilidad y usando la región del kinetoplasto (71P) se incrementó al 78%; el grupo de 45 dpi usando la secuencia de la región satélite (C3) presentó 7% y usando la región del kinetoplasto (71P) alcanzó el 64 %. Resultando altamente específico para ambas regiones del ADN satélite (C3) y ADN kinetoplasto (71P) con valores del 100%.
- 7.5. La elección de la secuencia usada en el qPCR “blanco de amplificación” es un factor importante para desarrollar un qPCR altamente sensible y específico usando la secuencia de ADN del kinetoplasto (71P) de 118 pb, en comparación al ADN satélite (C3) de 166 bp.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1. Evaluar si la capacidad de adsorción y concentración de las micropartículas de QE al 1% es reproducible en muestras de orina con volúmenes mayores de 10 mL a 50 mL con la metodología aplicada en esta investigación.
- 8.2. Considerar el uso de un control interno para evaluar la calidad del ADN extraído al aplicar las micropartículas de QE al 1% en el diagnóstico de muestras de orina.
- 8.3. Diseñar nuevos cebadores de *T. cruzi* que amplifiquen secuencias de fragmentos menores a 100 pb para el uso de micropartículas de quitosano entrecruzadas al 1% y evaluar si la sensibilidad se incrementa.
- 8.4. Implementar y mejorar el método de desorción del complejo quitosano y ADN, la magnetización de micropartículas es una alternativa, esto haría que la prueba se desarrolle en tiempos menores al propuesto en esta investigación.
- 8.5. Realizar estudios empleando la técnica en muestras clínicas de orina de diferentes grupos de pacientes con Chagas y demostrar su eficiencia. Ej: Chagas congénito, esta prueba podría aplicarse en recién nacidos cuyas madres son reactivas a la enfermedad de Chagas usando bolsas colectoras para las muestras de orina, de esta forma se evitaría la toma de muestra sanguínea de recién nacidos y por ende el rechazo de los familiares; la técnica podría implementarse también para adecuada monitorización de los pacientes, así como el oportuno y eficaz tratamiento de pacientes con Chagas empleando muestras de orina.
- 8.6. Probar la utilidad de esta prueba de captura y concentración de ADN en orina desarrollada para *T.cruzi* en otros agentes infecciosos de enfermedades a partir de muestras de orina.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudelo,D., Kreplak,L., Tajmir-Riahi,H.A. (2016). Microscopic and spectroscopic analysis of chitosan-DNA conjugates. *Carbohydr Polym*, 10(137), 207-13.

Akbuğa,J., Ozbaş-Turan,S., Erdoğan,N. (2004). Plasmid-DNA loaded chitosan microspheres for in vitro IL-2 expression. *Eur.J.Pharm.Biopharm*, 58(3), 501-507.

Alameh,M., Dejesus,D., Jean.M., Darras,V., Thibault, M., Lavertu,M., Buschmann, M.D., Merzouki,A. (2012). Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *Int J Nanomedicine*,7,1399-414.

Alatorre-Meda,M., Taboadad,P., Sabinc,J., Krajewskad,B., Varela,L.M., Rodriguez,J.R. (2009). DNA- chitosan complexation: A dinamic light scattering study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 339 (1-3), 145-152. doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.02.014

Arca,H.C., Günbeyaz,M., Senel,S. (2009). Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines*, 8(7), 937–953. doi: 10.1586/erv.09.47.

Beltrán, J. (2010). Extracción y caracterización de quitosano del camarón titi y su aplicación en la liberación controlada de un fármaco. Tesis para optar el grado académico de Químico. Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Bern,C., Verastegui,M., Gilman,R.H., Lafuente,C., Galdos-Cardenas,G., Calderon,M,...Maguire, J. H. (2009). Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis*, 49(11), 1667-1674.

Berger,J., Reist,M., Mayer,J.M., Felt,O., Gurny, R. (2004a). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 57(1): 35-52.

Berger,J., Reist,M., Mayer,J.M., Felt,O., Peppas, N.A., Gurny,R.(2004b). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 57(1): 19-34.

Botezatu,I., Serdyuk,O., Potapova,G., Shelepov,V., Alechina,R., Molyaka,Y.,...Lichtenstein,A. (2000). Genetic Analysis of DNA Excreted in Urine: A New Approach for Detecting Specific Genomic DNA Sequences from Cells Dying in an Organism. *Clin Chem*, 46 (8),1078-84.

Brasil,P.E., De Castro,L., Hasslocher-Moreno,A.M., Sangenis,L.H., Braga,J.U. (2010). ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*,10, 337. doi:10.1186/1471-2334-10-337

Bravo-Anaya,L.M., Soltero,J.F., Rinaudo,M. (2016). DNA/chitosan electrostatic complex. *Int J Biol Macromol*, 88, 345–353.

Bruck,W.M., Slater,J.W., Carney,B.F. (2011). Chitin and chitosan from marine organisms. In: Kim S.K. (Eds.), Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives (pp.11-23). New York. USA: CRC Press.

Carlier,Y., Torrico, F. (2003). Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36(1), 767-771.

Carlier,Y., Sosa-Estani,S., Luquetti,A.O., Buekens, P. (2015). Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(3), 363-368.doi: 10.1590/0074-02760140405.

Castro-Sesquen,Y.E., Gilman,R.H., Yauri,V., Angulo,N., Verastegui,M., Velásquez,D.E.,...Bern,C. (2011). *Cavia porcellus* as a model for experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Am J Pathol*, 179(1), 281-288.

Castro-Sesquen, Y.E., Gilman, R.H., Yauri, V., Cok,J. Angulo,N., Escalante, H., & Bern,C. (2013). Detection of soluble antigen and DNA of *Trypanosoma cruzi* in

urine is independent of renal injury in the guinea pig model. *PloS one*, 8(3), e58480. doi:10.1371/journal.pone.0058480.

Chatelain, E. (2017). Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel?. *Comput Struct Biotechnol J*, 15, 98–103.

Chung, H.J., Castro, C.M., Im, H., Lee, H., Weissleder, R. (2013). A magneto-DNA nanoparticle system for rapid detection and phenotyping of bacteria. *Nat Nanotechnol*, 8(5), 369-375.

Cconislla, J.L., Jacinto, C., Maza, I., Jahuira, M., Pando, A., Mayta, H., Valderrama, A. (2016). Desarrollo de micropartículas de quitosano cuaternario y entrecruzado para la adsorción de ácido desoxirribonucleico (ADN). *Rev Soc Quím Perú*. 82(4).

Díaz, C. (2012). Preparación y caracterización de la sal de quitosano cuaternizado y su entrecruzamiento con glutaraldehído para la sorción del cromo (VI) de soluciones acuosas. Tesis para optar el título profesional de Lic. en Química. Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.

Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades-MINSA (CDC-Perú). (2018). Número de casos de enfermedad de Chagas según departamentos Perú 2013-2018. Recuperado de <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2018/SE03/chagas.pdf>

Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J.M., Diez, M., Levin, M.J., Favaloro, R.R., Freilij, H., Schijman, A.G. (2009). Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas Disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(4), e419.

Duffy, T., Cura, C.I., Ramirez, J.C., Abate, T., Cayo, N.M., Parrado, R., ... Schijman, A.G. (2013). Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(1), e2000.

El-Ashram,S., Al Nasre,I., Suo,X. (2016). Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. *Biotechnol Rep*,12, 33–39

Fakruddin,M., Hossain,Z., Afroz,H. (2012). Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *J Nanobiotechnology*, 10(1), 1-8. doi:10.1186/1477-3155-10-31.

Fukushima,T., Hayakawa,T., Okamura,K., Takeda,S., Inoue,Y., Miyazaki,K., Okahata.Y. (2005). Buffer solution can control the porosity of DNA-chitosan complexes. *J. Biomed. Mater*, (76B), 121-129.

Gámiz, M.A. (2016). Biodegradable hydrogels based on water-soluble chitosan for cell transplant. Tesis para optar el grado de Doctor en Tecnologías para la Salud y el Bienestar Biodegradable. Universidad Politécnica de Valencia, España.

Gomes,A.S., Silveira-Lacerda, E.P., Cunha-Junior J.P., de Souza, M.A., Favoreto, Junior S. (2004). Immunoblotting analyses using two-dimensional gel electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens. *Rev Soc Bras Med Trop*, 37(6), 454-9.

Gomes,Y.M., Lorena,V.M., Luquetti,A.O. (2009). Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz* ,104(1),115–121.

Gonçalves,V.L., Laranjeira,M., Fávere,V.T., Pedrosa,R.C. (2005). Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros*, (15)1. doi:10.1590/S0104-14282005000100005.

Gonzalez, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, N., Lizardi, P.M. (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(11),3356-60.

Grussu, M.C. (2012). Valoración y mejora de la extracción del genoma del VIH usando nanopartículas magnéticas. Tesis para optar el grado de Doctor. Universidad Santiago de Compostela, Galicia, España.

Guibal,E. (2004). Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Sep. Purif. Technol*, 38(1), 43-74,

Hoven,V.P., Tangpasuthadol,V., Angkitpaiboon,Y., Kiatkamjornwong,S. (2007). Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydr Polym*, 68(1), 44-53.

Illanes,S., Denbow, M.L., Smith, R.P., Overton, T.G., Soothill, P.W., Finning,K. (2006). Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine. *Prenat Diagn*, 26 (13), 1216–1218.

Iparraguirre,E., Manrique,A., Abel,E., Navarro,B., Cuizano,N.A., Medina,R., Llanosa, B.P. (2010). Estudio de la biosorción de ion oro (iii) mediante quitosano cuaternario y quitosano cuaternario entrecruzado. *Rev Soc Quím Perú*, 76(4), 355-365.

Jahuira-Arias, M.H., Pando,A., Acosta,J., Arocutipa,E., Solís,H., Cconislla,J., Maza,I., Jacinto,C.,... Mayta,H. (2016). Uso de quitosano para la recuperación de ADN. *Rev. Iberoam. Polímeros*,17 (6): 107-114.

Jain,T., Kumar,S., Dutta,P.K. (2015). Chitosan in the Light of Nanobiotechnology: A Mini Review. *J Biomed Tech Res*, 2(1): 10. doi: 10.19104/jbtr.2015.103

Jansson,D. (2010). Development and characterization of chitosan-plasmid DNA nanoparticles. Tesis para título de Maestro en Ciencias. Tampere University of Technology, Tampere, Finlandia.

Knaul,J.Z., Hudson,S.M., Creber,K.A.M. (1999). Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: Proposal of a new reaction mechanism. *J Polym Sci Pol Phys*, 37,1079–1094.

Karni,M., Zidon,D., Polak,P., Zalevsky,Z., Shefi,O. (2013). Thermal degradation of DNA. *DNA and Cell Biology*, 32(6), 298-301.

Khairul,M. (2011). Polyelectrolyte complex materials from chitosan and gellan gum. Thesis Doctor of Philosophy. University of Wollongong, Wollongong, Australia.

Khosravinia,H. & Ramesha, K.P. (2007). Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *Afr J Biotechnol*, 6 (3),184-187.

Knezevic-Jugovic, Z., Petronijevic,Z., Smelcerovic,A. (2011). Chitin and chitosan from microorganisms. In: Kim S.K (Eds), Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives(pp. 25-36). New York, USA: CRC Press.

Kyzas,G.Z & Dimitrios,N.B. (2015). Recent Modifications of Chitosan for Adsorption Applications: A Critical and Systematic Review. *Mar. Drugs*, 13, 312-337.

Lechuga, L.M. (2010). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. Recuperado de http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf

Liao,Z.X., Peng,S.F., Ho,Y.C., Mi,F.L., Maiti,B., Sung,H.W. (2012). Mechanistic study of transfection of chitosan/DNA complexes coated by anionic poly (γ glutamic acid). *Biomaterials*, 33 (11), 3306–3315.

Lichtenstein,A.V., Melkonyan,H.S., Tomei L.D., Umansky,S.R. (2001). Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 945, 239-249.

Mahaninia,M.H., & Wilson,L.D. (2017).Phosphate uptake studies of cross-linked chitosan bead materials. *J Colloid Interface Sci*, 485 (1), 201-212.

Mao,H.Q., Roy,K., Troung-Le,V.L., Janes, K.A., Lin, K.Y., Wang, Y., August, J.T., Leong, K.W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*, 70(3), 399-421.

Martínez –Ezquerro,J.D., Trejo-Becerril,C., Dueñas-Gonzales, A. (2008). El ADN circulante y su potencial clinico. *Revista Ciencia*, 59(1), 64-73.

Melkonyan,H.S., Feaver,W.J., Meyer,E., Scheinker,V., Shekhtman,E.M., Xin,Z., Umansky,S.R. (2008). Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests. *Ann N Y Acad Sci*, 1137, 73-81. doi: 10.1196/annals.1448.015.

Messai, I.D., Lamalle,S., Munier,B., Verrier,Y., Ataman-Onal & T. Delair. (2005). Poly (D,Lactic acid) and chitosan complexes: interactions with plasmid DNA. *Colloids Surf A Physicochem*, 255 (2005) 65-72.

Messenger, L.A., & Bern, C. (2018). Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives.. *Curr Opin Infect Dis*, 5, 415-421. doi: 10.1097/QCO.0000000000000478.

Mi, F.L., Shyu, S.S., Kuan, C.Y., Lee, S.T., Lu, K.T., Jang, S.F. (1999). Chitosan–Polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer. *J. Appl. Polym. Sci*, 74(7), 1868-1879.

Moncayo,A. (1992). Chagas' Disease: Epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health Stat Qu*, 45,276-279.

Náquira,C. (2014). Urbanization of chagas disease in Peru: Experiences in prevention and control. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*,31,343-347.

Nash,J.A., Kwansa,A.L., Peerless,J.S., Kim,H.S., Y.G.Yingling. (2017). Advances in Molecular Modeling of Nanoparticle–Nucleic Acid Interfaces. *Bioconjugate Chem*, 28 (1), 3–10.

Nasti, A. (2016). Chitosan-based nanoparticles and microparticles. Tesi Dottorato di ricerca in scienza del farmaco. Universita' degli studi di napoli -Federico II, Italia.

Nanayakkara, I.A., Cao, W., White, I.M. (2017). Simplifying Nucleic Acid Amplification from Whole Blood with Direct Polymerase Chain Reaction on Chitosan Microparticles. *Anal Chem*, 89(6), 3773-3779.

Nieto, C.R., & Orellana, V.P. (2011). Aplicación del quitosano como promotor de floculación para disminuir la carga contaminante. Tesis para título de Ing. Ambiental. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.

Olivera, A.D., Barreiro, M.F., M.Lopretti. (2012). Microesferas de quitosano como potenciales transportadores de ácidos nucleicos y otros bioactivos. *Rev. Iberoam.polim*, 13(5).

Organización Panamericana de Salud (PAHO). (2018). El futuro de la lucha contra el Chagas. Recuperado de: https://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=article&id=4022:c-hagas-lucha&Itemid=1095.

Orozco, M.M., Enriquez, G.F., Alvarado –Olortegui, J.A., Cardinal, M.V., Schijman, A.G., Kitron, U., Gurtler, R.E. (2013). New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 88(5), 872-882.

Oryton, A.C., Monteiro, Jr., Airoidi, C. (1999). Some studies of crosslinking chitosan- glutaraldehyde inreaction in a homogeneous system. *Int. J. Biol. Macromol*, 26, 119-128.

Ozbas-Turan, S., Aral, C., Kabasakal, L., Keyer-Uysal, M., Akbuga, J. (2003). Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. *J Pharm Pharm Sci*, 6(1), 27-32.

Pandit,K.R., Nanayakkara,I.A., Cao,W., Raghavan,S.R. (2015). Capture and direct amplification of DNA on chitosan microparticles in a single PCR-optimal solution. *Analytical Chemistry*, 87(21), 11022-11029.

Piron,M., Fisa,R., Casamitjana,N., López-Chejade,P., Puig,L., Vergés,M., Gascón,J., Gómez,I., Prat,J., Portús,M., Sauleda,S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*, 103(3),195-200.

Qvarnstrom,Y., Schijman,A.G., Veron,V., Aznar,C., Steurer,F., da Silva, A.J. (2012). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(7), e1689.

Rabea,El., Badawy,M.E., Stevens,C.V., Smaghe,G., Steurbaut,W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of Action. *Biomacromolecules*, 4(6),1457-1465.

Rajasree,R & Rahate,K.P. (2013). An overview on modifications of chitosan and it's applications. *IJPSR*, 4(11), 4175-4193.

Ramachandran,S., Nandhakumar,S., Dhanaraju,M.D. (2011). Formulation and characterization of glutaraldehyde cross-linked chitosan biodegradable microspheres loaded with famotidine. *Trop J Pharm Res*,10, 309–316

Ramos, K. (Setiembre de 2005). El paciente chagásico en zona urbana (II) Chagas Indeterminado. 4^{to} Congreso Virtual de Cardiología - 4th, Argentina.

Ramírez,J.C., Cura,C.I., da Cruz Moreira,O., Lages-Silva,E., Juiz,N., Velázquez,E., Ramírez,J. D.,... Schijman, A. G. (2015). Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*, 17(5), 605-615.

Rauter,C., Mueller,M., Diterich,I., Zeller,S., Hassler,D., Meergans,T., Hartung,T. (2005). Critical evaluation of urine-based PCR assay for diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(8), 910-917.

Roca,C., Soriano-Arandes,A., Solsona,L., Gascon,J. (2015). Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. *Atención primaria*, 47(5), 308-317.

Rocha, F.L., Roque, A.L., de Lima, J.S., Cheida, C.C., Lemos, F.G., de Azevedo, F.C,... Jansen, A.M. (2013). *Trypanosoma cruzi* infection in Neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. *PloS One* 8 (7), e67463. doi: doi: 10.1371/journal.pone.0067463.

Rojas-Aguirre,Y., Aguado-Castrejón,K., González-Méndez,I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: la revolución de la terapia contra el cáncer. *Educación Química*, 27(4), 286-291.

Ruiz, M., Sastre, A., Guibal,E. (2002). Pd and Pt recovery using chitosan gel beads. I. Influence of the drying process on diffusion properties. *J. Sep Sci Technol*, 37(9), 2143-2166.

Sajomsang,W., Gonil,P., Tantayanon,S. (2009). Antibacterial activity of quaternary ammonium chitosan containing mono or disaccharide moieties: Preparation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol*, 44, 419–427.

Salvi,S., Gurioli,G., De Giorgi,U., Conteduca,V., Tedaldi,G., Calistri,D., Casadio,V. (2016). Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets*, 25(9), 6549-6559.

Sánchez,A.B., María,B., Vega-Baudrit,J., Madrigal,S. (2007). Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Rev. Iberoam. Polim*, 8(4), 241-267.

Sato,T., Ishii,T., Okahata,Y. (2001). *In vitro* gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22, 2075-2080.

Schijman, A.G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M., ... Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(1), e931. doi:10.1371/journal.pntd.0000931.

Siravegna,G., & Bardelli, A. (2014). Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. *Genome biology*, 15(8), 449. doi:10.1186/s13059-014-0449-4

Shahidi, F & Abuzaytoun. R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry production applications and health effects. *Adv Food Nutr Res*,49: 93-135.

Shi, Lu-E., & Tang Z.X. (2009). Adsorption of nuclease p1 on chitosan nanoparticles. *Braz. J. Chem. Eng*, 26(2), 435-443.

Sinha,V.R., Singla,A.K., Wadhawan,S., Kaushik,R., Kumria,R., Bansal,K., Dhawan,S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* 274, 1-33.

Sowmya, A & S. Meenakshi. (2014). A novel quaternized chitosan-melamine-glutaraldehyde resin for the removal of nitrate and phosphate anions. *Int J Biol Macromol*, 64,224-32.

Su,Y.H., Wang, M., Block,T.M., Landt,O., Botezatu,I., Serdyuk,O., Lichtenstein, A., Umansky,S. (2004a). Transrenal DNA as a diagnostic tool: important technical notes. *Ann N Y Acad Sci*, 1022, 81-89.

Su, Y.H., Wang, M., Brenner, D.E., Ng, A., Melkonyan, H., Umansky, S., Syngal, S., Block, T. M. (2004b). Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized,

soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn*, 6(2), 101-107.

Su, Y.H., Wang, M., Brenner, D. E., Norton, P. A. & Block, T. M. (2008). Detection of mutated K-ras DNA in urine, plasma, and serum of patients with colorectal carcinoma or, adenomatous polyps. *Ann N Y Acad Sci*, 1137, 197-206.

Tarleton, R.L. (2015). CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin Immunopathol*, 37, 233–238.

Tiwari, A.P., Rohiwal, S.S., Suryavanshi, MV., Ghosh, SJ., Pawar, SH. (2016). Detection of the genomic DNA of pathogenic α -proteobacterium *Ochrobactrum anthropi* via magnetic DNA enrichment using pH responsive BSA@Fe₃O₄ nanoparticles prior to in-situ PCR and electrophoretic separation, *Microchim Acta*, (183), 675-681.

Tan, H., Ma, R., Lin, C., Liu, Z., Tang, T. (2013). Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. *J Mol Sci*, 14(1), 1854-69.

Traina, M., Meymandi, S., Jason, S.S. (2016). Heart Failure Secondary to Chagas Disease: an Emerging Problem in Non-endemic Areas. *Curr. Heart Failure Rep*, 6, 295–301.

Traviezo, L. (2013). Dr. Luis Dao Lamah y el primer reporte de Chagas congénito. *Rev Venezolana de Salud Pública*, 1, 69-75.

Umansky, SR., Tomei, LD. (2006). Transrenal DNA testing: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Diagn*, 6(2), 153-63.

Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Solano, M., Carlier, Y., Svoboda, M. (2003). Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*, 68(5), 574-582.

Wagner, J. (2012). Free DNA--new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? *Biochem Med*, 22(1), 24-38.

Wang, Y., Zhang, X., Guangcan, Y. (2015). Single molecular analysis of the interaction between DNA and chitosan. *RSC Advances*, 5(37), 29594-29600.

Weerakoon, KG., McManus, DP. (2016). Cell-Free DNA as a Diagnostic Tool for Human Parasitic Infections. *Trends Parasitol*, 32(5), 378-91.

Wendling,A.P., Vitelli-Avelar,D.M., Sathler-Avelar,R.S., Geiger,S.M., Teixeira-Carvalho,A.,...Martins-Filho,O.A. (2011). The use of Ig G antibodies in conventional and non conventional immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease. *J. Immunol Methods*, 370 (1-2), 24–34. doi: 10.1016/j.jim.2011.05.003.

World Health Organization (WHO). (2010). Chagas disease. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

World Health Organization (WHO). (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemio- logical update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, 90, 33–44.

Xu, T., Xin, M.H., Li, M.C., Huang, H.L., Zhou, S.Q., Liu, J.Z. (2011). Synthesis, characterization and antibacterial activity of N, O-quaternary ammonium chitosan. *Carbohydr. Res*, 346, 2445–2450.

Xun, Mao., Yunqing, Ma., Aiguo, Z., Lurong, Z., Lingwen, Z., Guodong, L. (2009). Disposable Nucleic Acid Biosensors Based on Gold Nanoparticle Probes and Lateral Flow Strip. *Anal. Chem*, 81 (4), 1660–1668.

Yao, W., Jiao, Y., Luo, J., Du, M., Zong, L. (2012). Practical synthesis and characterization of mannose-modified chitosan. *Int J Biol Macromol*, 50(3), 821-825.

Yauri, V., Castro-Sesquen, Y.E., Verastegui, M., Angulo, N., Recuenco, F., Cabello, I.,...Gilman, R.H. (2016). Domestic Pig (*Sus scrofa*) as an Animal Model for Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Am J Trop Med Hyg*, 94(5), 1020-1027.

Zhang, W., Sun, C., Zhao, Y., Lu, X. (2011). One-pot synthesis and characterization of crosslinked quaternized chitosan microspheres as protein adsorbent. *Int J Biol Macromol*, 49(4), 688-692.

Zhao, X., Yu, S.B., Wu, F.L., Mao Z.B., Yu, C.L. (2006). Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. *J Control Release*, 112(2), 223-228.

X. ANEXOS

Anexo 1: Ficha Técnica del Quitosano de mediano peso molecular

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

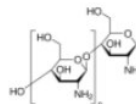
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Chitosan – medium molecular weight

Product Number: 448877
CAS Number: 9012-76-4
MDL: MFCD00161512



TEST	Specification
Appearance (Color)	Off White to Beige and Faint Brown to Light Brown
Appearance (Form)	Conforms to Requirements
Powder and/or Chips	
Deacetylation	75 - 85 %
Viscosity	200 - 800 cps
c = 1%, 1% Acetic Acid	
Specification: PRD.1.ZQ5.10000030084	

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

1 of 1

Anexo 2:
PROTOCOLO ESTANDARIZADO

1. Pesar 3 mg de quitosano entrecruzado al 1% (QE1%).
2. Descongelar las muestras de orina y ajustar el pH a 6.9 empleando un ácido o base fuerte.
3. Transferir 1 mL de la orina antes tratado a tubos de 2 mL e infectarla con 50 ng de plásmido.
4. Agregar las micropartículas anteriormente pesadas a cada tubo.
5. Homogenizar a temperatura ambiente en rotación de 350 ° a 50 rpm por una hora.
6. Transcurrido el tiempo, llevar a centrifugar a máxima velocidad por 30 minutos.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL. Adicionar 300 ul en tampón EDTA 0.5 M (pH 8) - SDS 10 % al pellet de micropartículas en el fondo del tubo.
8. Homogenizar vigorosamente y colocar en un baño seco a 100°C por 30 minutos.
9. Transcurridos los 30 minutos, agregar 500 ul de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), homogenizar en vórtex y centrifugar a 16 000 g (13 000 rpm) por 5 minutos.
10. Transferir 400 ul de la fase superior un tubo nuevo y agregar 400 µl de cloroformo: isoamílico (24:1), homogenizar manualmente y centrifugar a 16 000 g (13000 rpm) por 5 minutos.
11. Transferir 300 ul de la fase superior a un tubo de 1.5 mL conteniendo 30 µl de acetato de sodio (3M) y 1 mL de etanol absoluto.
12. Agitar manualmente cada tubo y llevar a - 70 °C durante 1 hora.
13. Centrifugar a 16 000 g (13000 rpm) por 30 minutos.
14. Descartar el sobrenadante. Lavar el pellet 2 veces con 1.0 mL de etanol al 70%, centrifugar a 16 000 g (13 000 rpm) por 5 minutos para cada lavado.
15. Resuspender el ADN con 100 µl de tampón AE (Qiagen, Alemania).

Anexo 3: Fotografías de la investigación

Preparación de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% (QE1%)



Figura 28. Quitosano de mediano peso molecular (gr).



Figura 29. Disolución del quitosano en Ac. acético.



Figura 30. Entrecruzamiento de las micropartículas con glutaraldehído



Figura 31. Micropartículas de QE 1%

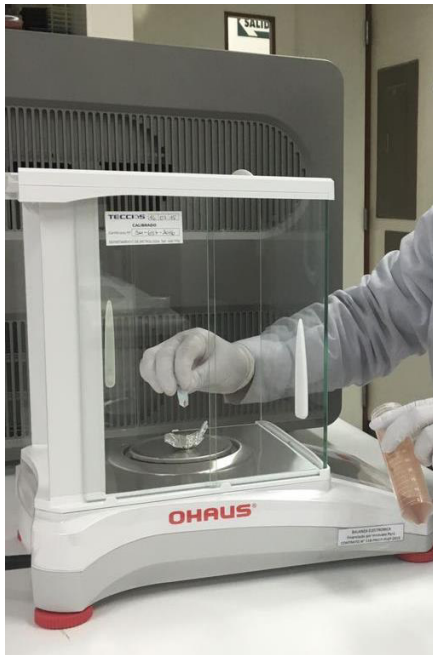


Figura 32. Pesaje de las micropartículas

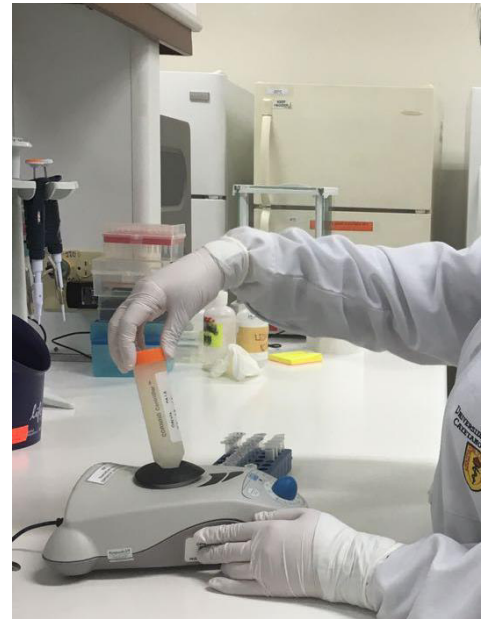


Figura 33. Homogenización de las muestras de orina

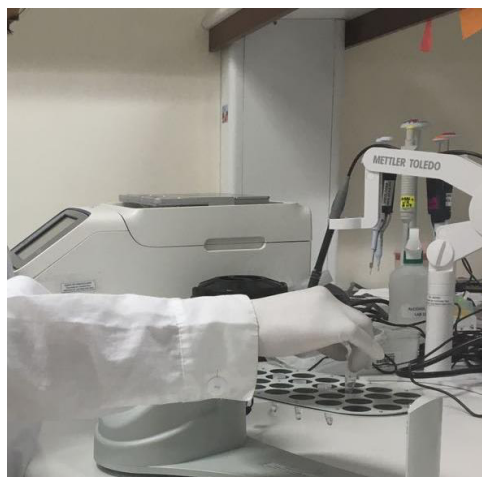


Figura 34. Muestras en el homogeneizador

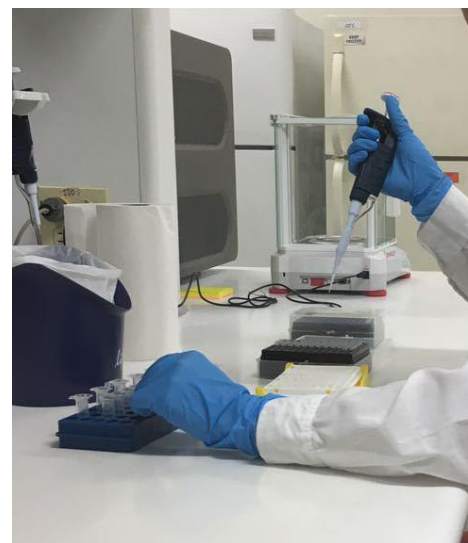


Figura 35. Adición del ADN extraído

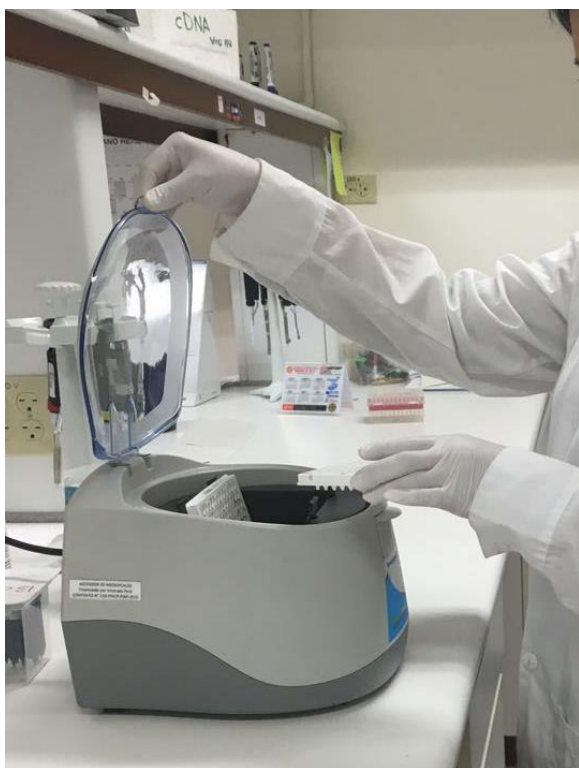


Figura 36. Placa de PCR en microcentrífuga.



Figura 37. Placa de PCR en termociclador de tiempo real.

Anexo 4: Número de casos de la Enfermedad de Chagas-Perú.

PERÚ

Ministerio
de Salud

Centro Nacional de Epidemiología,
Prevención y Control de
Enfermedades

Número de casos de enfermedad de Chagas según departamentos Perú 2013 - 2018*

DEPARTAMENTOS	Total Año (hasta la SE 52)						Corte en la SE actual 3					
	2013	2014	2015	2016	2017	2018*	2013	2014	2015	2016	2017	2018
HUANUCO	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
AMAZONAS	0	1	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0
ANCASH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
APURIMAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AREQUIPA	48	45	48	18	16	0	0	1	2	0	1	0
AYACUCHO	2	1	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0
CAJAMARCA	2	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CALLAO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CUSCO	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
HUANCAVELICA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ICA	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
JUNIN	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
LA LIBERTAD	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LAMBAYEQUE	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIMA	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
LORETO	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
MADRE DE DIOS	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TUMBES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOQUEGUA	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
PASCO	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
PIURA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PUNO	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SAN MARTIN	4	2	5	4	2	0	0	0	0	0	0	0
TACNA	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
UCAYALI	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total general	61	64	82	29	36	1	0	1	2	0	2	0

FUENTE : Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA (*) Hasta la SE 3 del 2018

PERÚ

Ministerio
de Salud

Centro Nacional de Epidemiología,
Prevención y Control de
Enfermedades

XII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

USO DE QUITOSANO PARA LA RECUPERACIÓN DE ADN

M. Helena Jahuira-Arias^{1,3,*}, Alejandra Pando¹, Janet Acosta¹, Edith Arocutipa¹, Hilda Solis³, José Cconislla², Ily Maza², Christian Jacinto², Ana Valderrama², Holger Mayta¹

1. Departamento de Ciencias, Laboratorio de Investigación y Desarrollo, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Avenida Honorio Delgado # 430, San Martín de Porres, +51, Lima, Perú. Correo electrónico: jahuirah@gmail.com

2. Departamento de Química, Universidad Nacional de Ingeniería, Avenida Tupac Amaru s/n, San Martín de Porres, Lima, Perú

3. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Universitaria/Calle Germán Amézaga s/n, Lima-Perú.

Recibido: Septiembre 2016; Aceptado: Febrero 2017

RESUMEN

El quitosano es un biopolímero lineal derivado de la desacetilación de la quitina que es ampliamente usado como agente potencial en aplicaciones biomédicas debido a su carga catiónica, biodegradabilidad y biocompatibilidad. La modificación química permite incrementar sus propiedades. El quitosano puede presentar complejos con el ADN a través de interacciones electrostáticas entre las unidades de glucosamina protonada del quitosano y la carga negativa de los grupos fosfatos del ADN. Por ello, en este estudio se propuso como objetivo modificar el quitosano para mejorar sus propiedades de interacción con el ADN sintetizando micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%. Para demostrar la captura de ADN se evaluó factores como el pH y la concentración, la evaluación se realizó mediante PCR en tiempo real, empleando ADN plasmídico.

Los resultados de caracterización demostraron que logró la modificación química del quitosano confirmado mediante espectrofotometría Infrarroja (FTIR). La mayor capacidad de adsorción de ADN se logró en medio a pH 6,9, la concentración óptima de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% fue de 6 mg/mL y el límite de detección fue de 10 copias/ul de ADN plasmídico.

Palabras claves: Quitosano, micropartículas, adsorción, interacciones electrostáticas, DNA, espectroscopia

ABSTRACT

Chitosan is a linear biopolymer derived from deacetylation of chitin which is widely used as a potential agent in biomedical applications due to their cationic charge, biodegradability and biocompatibility. Chemical modification can increase their properties. Chitosan can present complex with DNA through electrostatic interactions between protonated glucosamine units of the chitosan and the negatively charged phosphate groups of DNA. Therefore, in this study set out to modify the chitosan to improve its properties of interaction with DNA using cross-linked chitosan microparticles with 1% glutaraldehyde. To demonstrate DNA capture factors as pH and concentration was evaluated, the evaluation was performed by real-time PCR using plasmid DNA.

The characterization results achieved showed that chemical modification of chitosan, which was confirmed by infrared spectrophotometry (FTIR). The DNA absorption maximum was achieved at medium at pH 6.9, the optimum concentration of cross-linked chitosan microparticles with 1% glutaraldehyde was 6 mg/mL and the detection limit was 10 copies/ul plasmid DNA.

Keywords: Chitosan, microparticles, absorption, electrostatic interactions, DNA, Spectroscopy

INTRODUCCIÓN

El quitosano es obtenido de la desacetilación de la quitina que normalmente se encuentra en los exoesqueleto de crustáceos (cangrejos, camarones, langostas, sepia) y paredes celulares de los hongos, es un biopolímero catiónico biodegradable en comparación a los biopolímeros aniónicos,

los catiónicos se estudian ampliamente por formar complejos electrostáticos con biomoléculas aniónicas como ácidos nucleicos y proteínas [1–3]. El quitosano consiste de unidades repetidas de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, unidas por puentes glucosídicos, la unidad de D-glucosamina tiene un valor de pKa de aproximadamente 6,5, lo que conduce a la protonación de los grupos amina libres en medio ácido y/o pH neutro [4,5]. Debido a su carga catiónica, el quitosano puede formar complejos a escala nanométrica con ácidos nucleicos cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas y de ese modo proporcionar una protección eficaz de los complejos con ácidos nucleicos. A través del tiempo numerosas modificaciones químicas del quitosano se han desarrollado con el fin de mejorar su eficiencia, generalmente modificaciones hidrófobas, hidrófilas, anfifílicas, etc. [6]. El interés de la modificación de quitosano con glutaraldehído se ha incrementado recientemente, la reacción de glutaraldehído con los grupos amina primaria produce la reticulación covalente con glutaraldehído, esta modificación es explorada en muchas circunstancias con el fin de detectar la presencia de funciones orgánicas amina libre [7].

En este artículo, usamos micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído (1%) mediante análisis en PCR en tiempo real, se evaluaron factores como el pH y la concentración de micropartículas para mejorar la capacidad de adsorción.

Los hallazgos de este estudio podrían proveer importante información para futuras aplicaciones en el campo del diagnóstico molecular.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. Quitosano de mediano peso molecular (75–85% desacetilación), glutaraldehído de grado I, 25%, fenol-clorofomo-alcohol isoamílico 25:24:1, ácido 2 morfolino-ácido etanosulfónico (MES), Tris-KCl, fueron obtenidos de *Sigma-Aldrich*. Ácido acético (99,9%), etanol de grado molecular de *Merck*, tampón fosfato salino (*Life Technologies*), agua ultra pura (*Milipore*).

El ADN obtenido del plásmido recombinante pZErO que contenía un fragmento de ADN genómico de 195 pb de *Arabidopsis thaliana*-IAC (Internal amplification control).

Equipos. Se utilizó una balanza analítica (*Ohaus*) con sensibilidad $\pm 0,0001$ g, las reacciones se llevaron a cabo en plancha de calentamiento con agitación magnética (*Velp Scientifica*), tamices (*W.S. Tyler*) No 100, estufa (*Fisher Scientific*), liofilizador (*Lobconco*). Para la caracterización físico-química se utilizó: Espectrómetro FTIR 1800 (*Shimadzu*). Para la evaluación de la calidad y cantidad de ADN se utilizó *Nanodrop* (*Thermo Scientific*) y para el PCR en tiempo real el termociclador *Light Cycler® 96 System* (*Roche, LifeScience*).

Metodología. Síntesis de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído

al 1%. Para la síntesis se disolvieron 2 gramos de quitosano de peso molecular medio (*Sigma Aldrich*) en 150 mL de ácido acético al 2% (*Merck*), el entrecruzamiento se logró agregando glutaraldehído (*Sigma Aldrich*) a una concentración final de 1% (v/v). La mezcla se mantuvo bajo agitación constante en una plancha con control de temperatura (*Velp Scientifica*) hasta que se observó la formación de un gel (> 8 horas). Posteriormente, se filtró y lavó con abundante agua ultra pura (*Milipore*) para remover el entrecruzante que no reaccionó, posteriormente el quitosano se seco en una incubadora (*Fisher Scientific*), a la temperatura de 60°C. Por último, se liofilizó durante 48 horas y finalmente se procedió a moler mecánicamente y reducir el tamaño de la muestra obtenida mediante un tamiz con una malla de No. 100 (*W.S.Tyler*).

Caracterización del quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%. Espectroscopia FTIR. Los espectros infrarrojos fueron realizados en espectrofotómetro infrarrojo con transformada de *Fourier*. Se prepararon películas del mismo disolviendo 250 mg de quitosano en 50 mL de ácido acético al 6% (v/v) formándose un gel transparente y viscoso, este gel se colocó en moldes plásticos con un área de 13 cm de diámetro y a continuación se secaron a temperatura ambiente en ausencia de luz hasta la obtención de la película.

Las muestras fueron analizadas y los espectros obtenidos de múltiples escaneos. La resolución espectral fue de 4 cm^{-1} en un intervalo de las regiones $400\text{--}4.000\text{ cm}^{-1}$.

Factores de unión entre el micropartículas de Quitosano entrecruzado con glutaraldehído (1%) con ADN. El efecto del pH para la formación de complejos quitosano-ADN fue evaluado mediante el uso de tres diferentes tampones: ácido 2,morfolino-etanosulfónico (MES, 20 mM, pH 5), ácido 2,morfolino-etanosulfónico (MES, 20 mM, pH 6), Tampón fosfato salino (PBS, 20 mM, pH 6,9), adicionando 5 mg/mL de micropartículas y ADN (50 ng) en cada uno de estos tampones. La suspensión permaneció en un constante movimiento rotativo durante 60 minutos. Posteriormente las micropartículas fueron separadas mediante centrifugación a máxima velocidad (21.000 g). El sobrenadante fue transferido a un tubo de 1,5 mL para su posterior evaluación. El ADN fue separado del complejo micropartícula de quitosano-ADN mediante la extracción con una mezcla de fenol y cloroformo. El ADN purificado fue guardado a -20°C , hasta su evaluación.

Posteriormente, se evaluó la cantidad necesaria de micropartículas de quitosano entrecruzado (1%) en intervalos de 2 a 8 mg/mL, siguiendo la metodología anterior. Todos los ensayos fueron realizados como mínimo por duplicado.

Obtención de ADN plasmídico. Células que contenían el IAC que contiene una secuencia de *Arabidopsis thaliana*, se purificó usando el método de extracción basado *QIA prep Spin miniprep* (*Qiagen*), posteriormente se cuantificó mediante el espectrofotómetro (*Nanodrop*, *Thermo*

Scientific) para obtener una concentración deseada para los experimentos. El ADN fue guardado a -20°C .

Límite de detección del ADN empleando con micropartículas entrecruzadas con glutaraldehído 1%. Se realizaron ensayos “*in vitro*” para determinar el límite de detección en muestras infectadas con ADN con y sin micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%, se determinó el límite de detección a partir de ADN del plásmido IAC. Para ello se realizaron diluciones seriadas del plásmido 10^6 copias/ul hasta 10^0 copias/ul.

Cuantificación del ADN absorbido. Para cuantificar la cantidad de ADN capturado, se analizó los respectivos sobrenadantes y complejos micropartículas–ADN mediante PCR en tiempo real (qPCR) usando el termociclador *Light Cycler® 96 System* (Roche Life Science) con el siguiente programa de amplificación: 2 minutos a 50°C , 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 58°C .

La mezcla de reacción consistió usando (frase confusa) *Fast Star Universal Probe Master Mix* (Roche Diagnostics GmbH Corp, Mannheim, Germany) en un volumen final de 20 ul, se emplearon los cebadores IAC Fw a concentración 0,5 uM (5' ACCGTCATGGAACAGCACGTA 3') e IAC Rva concentración 0,5 uM (5' CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT 3') (Invitrogen, Life Sciences) y la sonda IAC Tq (Invitrogen, Life Sciences), marcada con VIC y 5 ul de ADN purificado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier. Se logró sintetizar el quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% a partir de quitosano de peso molecular medio. En la Figura 1 se pueden observar los espectro FTIR del quitosano y las micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído (1%). Se pueden observar las bandas características de los grupos funcionales del quitosano que corresponden a la vibración de los grupos $-\text{NH}_2$ a 3.364 cm^{-1} , grupo $-\text{OH}$ a 3.292 cm^{-1} , grupos $\text{N}-\text{H}$ de una amida primaria a 1.659 cm^{-1} , en 1.379 cm^{-1} corresponde al $-\text{CH}_3$ y deformación del $\text{C}-\text{CH}_3$, a 2.919 y 2.876 cm^{-1} corresponde a las tensiones del grupo $\text{C}-\text{H}$, a 1.033 y 1.091 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del esqueleto propias de su estructura y finalmente a 884 cm^{-1} la tensión $\text{C}-\text{H}$ de los grupos anoméricos, todos ellos resultan acordes a las características planteado por *Hidalgo et al.* [8]. Respecto a las micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído al 1% se evidencia que el contenido de los grupos de carbonos e hidrógenos se incrementan, sin embargo el contenido del nitrógeno se reduce, al final de la reacción

a 1.635 cm^{-1} se observa el grupo imino que se forma al entrecruzar el quitosano con glutaraldehído comprobándose la modificación química, también reportada por Oryton et al. [7].

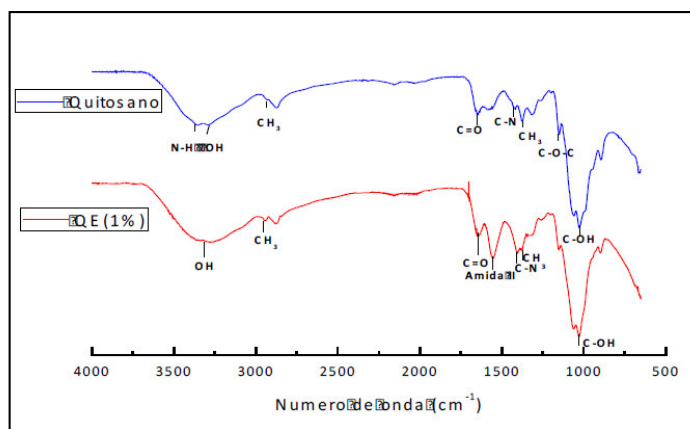


Figura 1. Comparación de los espectros FTIR del quitosano y micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%.

Factores de adsorción de ADN usando micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído (1%). La evaluación mediante qPCR demostró la capacidad de adsorción del ADN plasmídico. Los resultados a diferentes valores de pH entre 5 y 6,9, nos muestra que los sobrenadantes no liberan ADN, siendo negativos a la presencia de ADN plasmídico a excepción del pH 5, por lo que podemos afirmar que existe la formación de complejos de micropartículas de quitosano con el ADN, al evaluar estos complejos, se observa que la unión es más eficiente a pH 6,9 (Figura 2). Algunos estudios reportan la capacidad de unión del quitosano con el ADN en medios ácidos, esto debido a la interacción electrostática entre la carga positiva del quitosano y la carga negativa del grupo fosfato del ADN [2], sin embargo se ha reportado que la unidad de D-glucosamina del quitosano tiene un valor pK_a de $\sim 6,5$, lo que conduce a la protonación de los grupos amino libres a pH ácido y/o pH neutro [3,4]. De acuerdo a nuestros resultados la máxima capacidad de adsorción se presenta a pH 6,9, por lo que al realizar la modificación del quitosano a micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%, la capacidad de interacción debido al pK se mantiene, pero además se adiciona otro mecanismo de unión física, es así, que Fukushima et al. [9] reporta que la porosidad en conjugados entre el quitosano y el ADN se reduce en medio PBS cercano a 7, esto podría explicar un tipo de unión más estable que permite reforzar la unión de enlaces fosfodiéster, así también Krajewska et al. [10] demostraron el radio del tamaño del poro formado en membranas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído es aproximadamente 1 nm, según Pandit et al. [11] los grupos amino pueden encontrarse aún ionizados a pH por encima del pK_a del quitosano cuando interactúa con pequeñas moléculas aniónicas, demostrando la

combinación de interacciones electrostáticas e interacciones estéricas, reafirmando nuestros resultados que micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído adsorben mayor cantidad de ADN a un pH óptimo 6,9 (por encima del pK_a del quitosano).

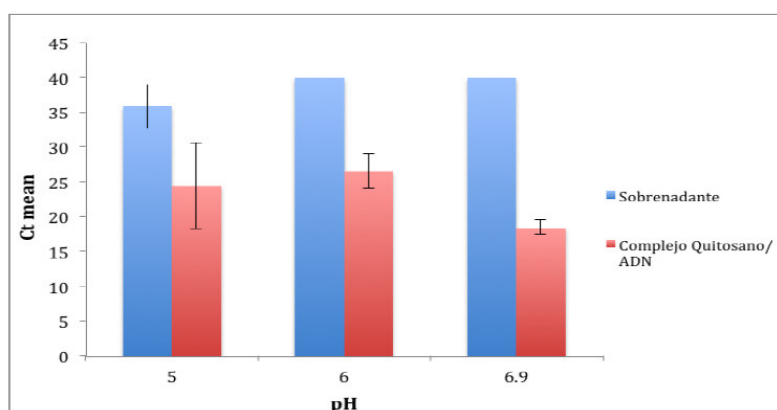


Figura 2. Evaluación de la adsorción de ADN usando micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído al 1% mediante qPCR

La evaluación de las diferentes concentraciones de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% en un intervalo de 2 a 8 mg/mL, muestran que la concentración 6 mg/mL presenta mayor capacidad de adsorción del ADN plasmídico, los sobrenadantes fueron también evaluados y solo a partir de 6 mg/mL no presento liberación de ADN (Figura 3), por estas razones la concentración de 6 mg/mL es la óptima. Otros estudios con micropartículas de hidrogel han reportado concentraciones de 7,2 mg/mL para la adsorción de proteínas [12].

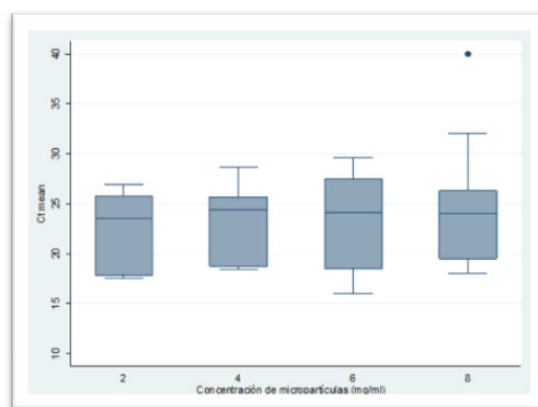


Figura 3. Adsorción del ADN a diferentes concentraciones de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%.

Límite de detección del ADN en micropartículas entrecruzadas con glutaraldehído 1%.

El límite de detección de la curva preparada con diluciones de ADN plasmídico (IAC) a

diferentes concentraciones con micropartículas de quitosano entrecruzado ó sin ellas es similar en ambos (Figura 4), por lo que puede afirmarse que el límite de detección es 10 copias/ul de ADN plasmídico (IAC). Los valores de Ct mayores son considerados negativos que representan a 1 copia/ul ($\text{Log } 10^0$). El análisis de la curva del ADN plasmídico IAC presentan un $R^2 = 0,985$ y la curva de ADN plasmídico usando micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% fue de $R^2 = 0,993$.

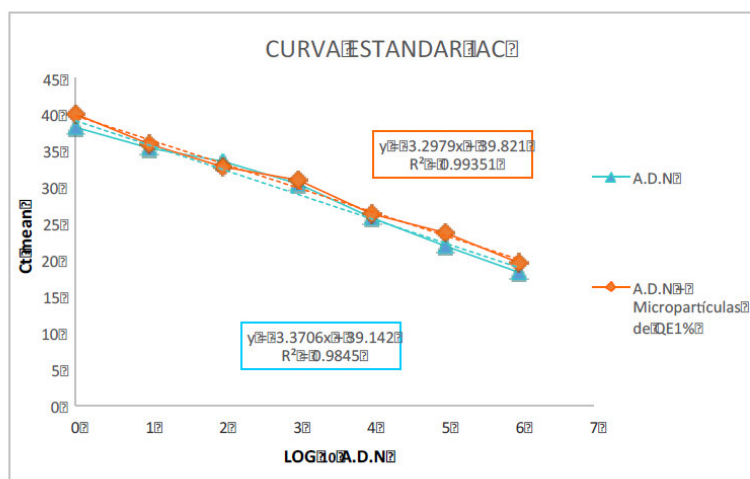


Figura 4. Comparación de curva estándar de ADN plasmídico (IAC) usando micropartículas de quitosano entrecruzado.

CONCLUSIONES

Se logró sintetizar micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%, el pH óptimo para la adsorción de ADN es de 6,9, la concentración óptima de micropartículas para adsorber 50 ng de ADN plasmídico (IAC) es de 6 mg/mL. Finalmente el límite de detección usando micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1% es de 10 copias/ul de ADN.

Agradecimientos. Queremos agradecer la colaboración del *Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ing. Química de la Universidad Nacional de Ingeniería y Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Esta investigación ha sido financiada por *Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad-Innovate Perú (FINCyT N° 118-PNICP-PIAP-2015)*.

BILIOGRAFÍA

1. H. Onishi, Y. Machida. "Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan on in mice", *Biomaterials*, **20**, 175 (1999)
2. Cao W, Easley CJ, Ferrance JP, Landers JP, *System Analytical Chemistry*, **78**, 7222 (2006)

3. Samal SK, Dash M, Van Vlierberghe S, Kaplan DL, Chiellini E, van Blitterswijk C, Moroni L, Dubruel P, *Chem. Soc. Rev.*, **41(21)**, 7147 (2012)
4. Anthonsen MW, Smidsrød O, *Carbohydr. Polym.*, **26**, 303 (1995)
5. Domard A, *PH. Int. J. Biol. Macromol.*, **9**, 98 (1987)
6. Layek B, Lipp L, Singh J, *Int. J. Mol. Sci.*, **16(12)**, 28912 (2015)
7. Oyrton AC, Monteiro Jr, Claudio Airolidi, *Intern. J. Biological Macromolecules*, **26**, 119 (1999)
8. Hidalgo C, Fernández M, Nieto O, Paneque A, Fernández G, Llópiz J, *Rev. Iberoam. Polimeros*, **10(1)** (2009)
9. Fukushima T, Hayakawa T, Kawaguchi M, Ogura R, Inque Y, Morishita K, K. Miyazaki, *Dental Material J.*, **24(3)**, 414 (2006)
10. Krajewska B, Olech A, *Polym. Gels Networks*, **1**, 33 (1996)
11. Pandit K, Nanayakkara I, Cao W, Raghavan S, White IM, *Analytical chemistry*, **87**, 21 (2015)
12. Castro-Sesquen Y, Gilman RH, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Sánchez G, Valencia E, Liotta L, Bem C, Luchini A "The working group on Chagas diseases in Bolivia y Perú", *PLOs One. PLoSNegl Trop. Dis.* **8(10)** (2014)